

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 February 2001 (14.02.01)	
International application No. PCT/EP00/05313	Applicant's or agent's file reference
International filing date (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date (day/month/year) 08 June 1999 (08.06.99)
Applicant SCHAEFER, Dirk, Johannes et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

15 December 2000 (15.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer A. Karkachi Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05313	International filing date (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date (day/month/year) 08 June 1999 (08.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61L 27/00		
Applicant UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 15 December 2000 (15.12.00)	Date of completion of this report 29 October 2001 (29.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05313

1. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-43 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____ 1-31 _____, filed with the letter of 15 October 2001 (15.10.2001)
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/16-16/16 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
/EP 00/05313

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-31	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the documents listed below.
Unless otherwise indicated, the passages cited in the international search report are considered to be of relevance.

D1: EP-A-0 339 607 (ITAY SAMUEL) 2 November 1989
(1989-11-02)

D2: WO-A-99/25396 (THE REGENTS OF UNIV. MICHIGAN ET AL.) 27 May 1999 (1999-05-27)

D3: DE-A-34 10 631 (UNIV. RAMOT) 27 September 1984
(1984-09-27)

D4: WO-A-96/03160 (CHILDRENS MEDICAL CENTER) 8 February 1996 (1996-02-08)

D5: US-A-5 374 550 (SMITH R.L. ET AL.) 20 December 1994 (1994-12-20)

D6: WO-A-99/21497 (SULZER ORTHOPAEDIE AG) 6 May 1999
(1999-05-06).

2. Novelty (PCT Article 33(2))

The technical features of **Claim 1** have not been described in the cited prior art and therefore appear to be novel (PCT Article 33(3)). Since all the additional claims refer back to Claim 1, **Claims 2-31** are also novel (PCT Article 33(3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3. Inventive step (PCT Article 33(3))

None of the prior art citations suggests a joint construct which contains a carrier material as well as cartilage and bone tissue, the cartilage and bone tissue being securely joined and the joint construct having a joint side and an anchor side. In particular, the cited prior art relates to cell suspensions - see document D4 - or to unstratified cell preparations; see documents D1-D3. Document D6 describes the use of stratified columns of tissue for repairing cartilage defects. However, these columns of tissue do not extend into the bone layer of the relevant defect. The use of a similarly stratified joint construct comprising a bone component would represent a non-obvious modification to this disclosure for a person skilled in the art. Claim 1, and consequently all the remaining Claims 2-31, therefore appear to be inventive (PCT Article 33(3)).

4. Industrial applicability (PCT Article 33(4))

The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing whether the subjects of the present **Claim 2** ("... for improving angiogenesis [contains] a growth factor protein ...") and **Claims 5 and 6**, which refer back thereto, are industrially applicable. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for instance, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims relating to the medical use of a compound; however, claims are allowed which relate to the first medical use of a known compound or the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

use of such a compound in the manufacture of a drug
for a new medical use.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 99/60951	02 December 1999 (02.12.1999)	21 May 1999 (21.05.1999)	22 May 1998 (22.05.1998)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The dependency of **Claims 23 and 25** is unclear. Those claims relate to a process as per Claims 10-22 or 10, and yet they concern only a process for producing the relevant bone tissue. Furthermore, in Claim 10 the term "bone component" is used for element (c); however, in Claims 23 and 25, the applicant uses the term "bone tissue". Claim 25 also does not indicate that the bone tissue produced concerns element (c).

Claims 23 and 25 therefore do not meet the requirements for clarity (PCT Article 6).

THIS PAGE BLANK

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

KELLER, Günter
LEDERER, KELLER & RIEDERER
Prinzregentenstrasse 16
D - 80538 München
ALLEMAGNE

EINGANG / RECEIPT
30.06.2001

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

29.10.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/05313

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
08/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
08/06/1999

Anmelder

UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Ferro Vasconcelos, M

Tel. +49 89 2399-7000

8062



THIS PAGE BLANK (U)SDTC

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 31 OCT 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T 16



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts ----	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05313	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61L27/00		
Anmelder UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 15/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Langer, A Tel. Nr. +49 89 2399 7809 

THIS PAGE BLANK

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-43 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-31 mit Telefax vom 15/10/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/16-16/16 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05313

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-31
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-31
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-31
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (1857)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen; sofern nicht anderweitig angegeben, werden die im Internationalen Recherchenbericht zitierten Passagen als die relevanten angesehen.
D1: EP-A-0 339 607 (ITAY SAMUEL) 2. November 1989 (1989-11-02)
D2: WO 99 25396 A (THE REGENTS OF UNIV MICHIGAN ET AL) 27. Mai 1999 (1999-05-27)
D3: DE 34 10 631 A (UNIV RAMOT) 27. September 1984 (1984-09-27)
D4: WO 96 03160 A (CHILDRENS MEDICAL CENTER) 8. Februar 1996 (1996-02-08)
D5: US-A-5 374 550 (SMITH R L ET AL) 20. Dezember 1994 (1994-12-20)
D6: WO 99 21497 A (SULZER ORTHOPAEDIE AG) 6. Mai 1999 (1999-05-06)

2. Neuheit (Art. 33 (2) PCT)

Die technischen Merkmale des **Anspruchs 1** sind im zitierten Stand der Technik nicht beschrieben und erscheinen daher neu im Sinne des Art. 33 (3) PCT. Da sich alle weiteren Ansprüche auf Anspruch 1 beziehen, sind auch **Ansprüche 2-31** neu im Sinne des Art. 33 (3) PCT.

3. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33 (3) PCT)

Kein Dokument aus dem zitierten Stand der Technik legt ein Gelenkkonstrukt nahe, ein Trägermaterial, sowie Knorpelgewebe und Knochengewebe enthält, wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind, und das Gelenkkonstrukt eine Gelenk- und eine Ankerseite aufweist. Im Einzelnen bezieht sich der zitierte Stand der Technik auf Zellsuspensionen (Dokument D4) oder ungeschichtete Zellzubereitungen (Dokumente D1-D3). Dokument D6 beschreibt die Verwendung von geschichteten Gewebesäulen zur Ausbesserung von Knorpeldefekten. Diese Gewebesäulen reichen jedoch nicht bis in die Knochenschicht des betroffenen Defekts. Die Verwendung eines ähnlich

THIS PAGE BLANK (USPTO)

geschichteten Gelenkkonstrukts mit Knochenkomponente wäre für den Fachmann keine offensichtliche Modifikation dieser Offenbarung.

Anspruch 1 und damit auch alle übrigen Ansprüche 2-31 erscheinen daher erfinderisch im Sinne des Art. 33 (3) PCT.

4. Industrielle Anwendbarkeit (Art. 33 (4) PCT)

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände des vorliegenden **Anspruchs 2** ("...zur Verbesserung der Angiogenese ein Wachstumsfaktorprotein...") und der hierauf bezugnehmenden **Ansprüche 5 und 6** gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 99/60951	02/12/1999	21/05/1999	22/05/1998

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Die Abhängigkeit der **Ansprüche 23 und 25** ist unklar: einerseits beziehen sie sich auf ein Verfahren gemäß Ansprüche 10-22 bzw. 10, andererseits handelt es sich nur um

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verfahren zur Herstellung des beteiligten Knochengewebes. Darüberhinaus wird in Anspruch 10 der Begriff "Knochenkomponente" für Element (c) verwendet, in den Ansprüchen 23 und 25 verwendet der Antragsteller dahingegen den Begriff "Knochengewebe". Anspruch 25 enthält auch nicht den Verweis, dass es sich bei dem hergestellten Knochengewebe um das Element (c) handelt. Die Ansprüche 23 und 25 erfüllen daher nicht die Klarheitsanforderungen nach Artikel 6 PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Universitätsklinikum Freiburg

Patentansprüche:

1. Biologisches, zumindest teilweise in vitro hergestelltes Gelenkkonstrukt, das wenigstens folgende Bestandteile umfaßt:

- a) wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial;
- b) Knorpelgewebe enthaltend Chondrocyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz;
- c) Knochengewebe enthaltend Osteoblasten und/oder Osteocyten und Knochensubstanz;

wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Gelenkkonstrukt eine Gelenkseite aufweist, die Kontakt zu einem anderen Gelenkteil haben kann und deren Oberfläche aus Knorpelgewebe besteht, und eine Ankerseite, die zur Verankerung des Gelenkkonstrukts im Knochenschaft dienen kann und die aus Knochengewebe besteht.

2. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe zur Verbesserung der Angiogenese ein Wachstumsfaktorprotein, Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen, oder mit einem Wachstumsfaktorgen transfizierte Zellen enthält.

3. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankerseite wenigstens einen zylinderförmigen Zapfen aufweist, der mit einem Knochenschaft verbunden werden kann.

THIS PAGE BLANK

4. Biologisches Gelenkkonstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich wenigstens eine Bandkomponente umfaßt, die zwei Gelenkteile funktionell miteinander verbinden kann.

5. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gelenkkonstrukt zum Teilersatz einer Gelenkfläche geeignet ist und als einzelnes präformiertes Konstrukt ausgebildet ist.

6. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gelenkkonstrukt zum Teilersatz einer Gelenkfläche geeignet ist und als osteochondraler Zylinder ausgebildet ist.

7. Biologischer Gelenkersatz, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Gelenkkonstrukte nach einem der Ansprüche 3-4 mit ihren Gelenkseiten Kontakt zueinander haben und mit ihren Ankerseiten in 2 verschiedenen Knochenschäften verankert werden können.

8. Biologischer Gelenkersatz nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Gelenkkonstrukte durch wenigstens 2 Bandkomponenten verbunden sind.

9. Biologischer Gelenkersatz nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Gelenkkapsel aufweist.

10. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstruktes nach einem der Ansprüche 1-9, das folgende Schritte umfaßt:

a) Bereitstellung einer Knochenkomponente durch Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit Osteoblasten;

b) Bereitstellung einer Knorpelkomponente durch Herstellung einer Suspension von Chondrocyten in einem

THIS PAGE BLANK

Medium oder Gel oder durch Besiedelung einer bioverträglichen Trägersubstanz mit Chondrocyten;

c) Verbindung der Knochen- und der Knorpelkomponente, so daß das Trägermaterial in den Knorpel integriert wird;

d) Züchtung des Konstruktes in vitro, wobei durch Stimulation der Zellen zur Anheftung und zur Synthese ihrer gewebespezifischen extrazellulären Matrix eine biologische Vernetzung der zusammengesetzten Komponenten erreicht wird;

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial der Knochenkomponente (a) so geformt wird, daß es eine Gelenkseite zur Aufnahme einer Knorpelfläche und eine Ankerseite zur Verbindung mit einem Knochen aufweist.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bereitstellung der Knorpelkomponente (b)

aa) Chondrocyten in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert werden,

bb) diese Suspension mit der Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers gemischt wird,

cc) die Mischung in eine anatomisch gewünschte Form gebracht wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11- 12 dadurch gekennzeichnet, daß die Knochen- (a) und die Knorpelkomponente (b) vor der Verbindung getrennt in vitro kultiviert werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung (c) von Knochen- und Knorpelkomponente mittels Fibrinklebung erfolgt.

THIS PAGE BLANK

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß während der Verfestigung des Fibrinklebers bei der Herstellung der Knorpelkomponente das noch nicht durch Osteoblasten besiedelte Trägermaterial der Knochenkomponente in die Knorpelschicht gedrückt wird, so daß es fest eingebunden wird und,

daß später die Besiedelung der Knochenkomponente durch Osteoblasten erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-15, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin die Herstellung einer Bandkomponente aus faserartigen Materialien und Fibroblasten umfaßt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-16, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin die Herstellung einer Kapselkomponente aus faserartigen, membranösen Materialien und Fibroblasten umfaßt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-17, dadurch gekennzeichnet, daß an dem Trägermaterial der Knochenkomponente nach der Formgebung wenigstens eine Bandverbindungsstelle zur Anbringung von Gelenkbändern angebracht wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-18, dadurch gekennzeichnet, daß an dem Trägermaterial der Knochenkomponente wenigstens ein Kapselverbindungsareal zur Anbringung einer Gelenkkapsel angebracht wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-19, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Bandkomponente an einer Bandverbindungsstelle der Knochenkomponente gemäß Anspruch 18 angebracht wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-20, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Kapselkomponente an einem

THIS PAGE BLANK (USE

Kapselverbindungsareal der Knochenkomponente gemäß Anspruch 19 angebracht wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-21, dadurch gekennzeichnet, daß der Knochenkomponente Endothelzellen, ein Wachstumsfaktorprotein, oder mit einem Wachstumsfaktorgen transfizierte Zellen hinzugefügt werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 22 zur Herstellung von Knochengewebe (c); dadurch gekennzeichnet, daß Spongiosa als Trägermaterial verwendet wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß autoklavierte, humane, allogene Spongiosa als Trägermaterial verwendet wird.

25. Verfahren nach Anspruch 10 zur Herstellung von Knochengewebe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Isolierung von Knochenzellen oder Knochenvorläuferzellen;

b) Transfektion der Zellen durch nicht-viralen Gentransfer mit wenigstens einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor codiert;

c) Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit den transfizierten Zellen;

d) Züchtung der Zell-Trägermaterial-Konstrukte in vitro.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Zellen vor der Transfektion vermehrt werden.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Lipofektion erfolgt.

THIS PAGE BLANK (11/20/20)

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25-27 dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion transient ist.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 25-28, dadurch gekennzeichnet, daß das transfizierte Gen oder wenigstens eines der transfizierten Gene für einen Wachstumsfaktor codiert, der aus folgender Gruppe ausgewählt ist: EGF, bFGF, VEGF, BMP-1 bis BMP-20, TGF- β , PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, Ang I, Ang II.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 25-29 dadurch gekennzeichnet, daß das bioverträgliche Trägermaterial auch mit nicht transfizierten Zellen besiedelt wird.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 25-30, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Zellen stromale Zellen sind.

THIS PAGE BLANK (USDT)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

LEDERER, KELLER & RIEDERER
Prinzregentenstrasse 16
D - 80538 München
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

LEDERER, KELLER & RIEDERER
EINGANG / RECEIVED
23. JULI 2001

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

25/07/2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05313

Erl.: -----

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr)

08/06/2000

Anmelder

UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2a) übermittelt wird.

3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90^{bis} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswählerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Carla Louro

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsvorschriften zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsvorschriften.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsvorschriften, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19(1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 00/ 05313	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/06/1999
Anmelder UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld II).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-23

Biologisches Gelenkkonstrukt und Verfahren zur Herstellung

2. Ansprüche: 24,25

Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe und Spongiosa als Trägermaterial

3. Ansprüche: 26-32

Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe

4. Ansprüche: 33-35

Knochengewebe und Verwendung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05313

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61L27/26 A61L27/40 A61F2/08 A61F2/30 A61L27/38
C12N5/10 C12N15/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61L A61F C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 339 607 A (ITAY SAMUEL) 2. November 1989 (1989-11-02) Spalte 10, Zeile 3 - Zeile 7; Ansprüche; Beispiele 1-4	1,2,11, 13,14
X	WO 99 25396 A (THE REGENTS OF UNIV MICHIGAN ET AL) 27. Mai 1999 (1999-05-27) Seite 12, Zeile 22 - Seite 13, Zeile 11 Seite 14, Zeile 9 - Zeile 10 Seite 15, Zeile 21 - Zeile 26; Ansprüche; Beispiele	1,2,11
X	DE 34 10 631 A (UNIV RAMOT) 27. September 1984 (1984-09-27) Seite 3, Zeile 1 - Zeile 20 Seite 6, Zeile 16 - Zeile 34 Ansprüche; Beispiel 1	1,2,11, 13-16
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Juli 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. 07. 2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 03160 A (CHILDRENS MEDICAL CENTER) ✓ 8. Februar 1996 (1996-02-08) Seite 10, Zeile 22 - Zeile 27; Ansprüche; Beispiel 2	11,17
A	---	13-16
A	US 5 374 550 A (SMITH R L ET AL) ✓ 20. Dezember 1994 (1994-12-20) Spalte 2, Zeile 5 - Zeile 49; Ansprüche	1,2,11, 14,23
A	---	
A	WO 99 21497 A (SULZER ORTHOPAEDIE AG) ✓ 6. Mai 1999 (1999-05-06) Seite 1 Seite 2 Seite 7 Seite 21; Ansprüche 25-29; Abbildungen 10-12	1,3,4,7
A	---	
A	WO 96 39196 A (UNIV PITTSBURGH) ✓ 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Ansprüche	11,13,14
X,P	---	
X,P	WO 99 60951 A (ISOLAGEN TECHNOLOGIES INC) ✓ 2. Dezember 1999 (1999-12-02) Seite 30, Zeile 4 -Seite 33, Zeile 12	24,25
A	---	
A	EP 0 657 178 A (CORIMED GMBH) ✓ 14. Juni 1995 (1995-06-14) Zusammenfassung Ansprüche	24,25
A	---	
A	BEGLEY C T ET AL: "Comparative study of ✓ the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes" BIOMATERIALS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, Bd. 16, Nr. 15, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 1181-1185, XP004032874 ISSN: 0142-9612 Seite 1182, linke Spalte, Absatz 1 Seite 1184, linke Spalte, Absatz 2	24,25
Y	---	
Y	DE 38 10 803 A (BATTELLE INSTITUT E V) ✓ 12. Oktober 1989 (1989-10-12) das ganze Dokument	26,27, 29-35

	-/--	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	GAZIT D. ET AL.: "Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy." THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, Bd. 1, 25. März 1999 (1999-03-25), Seiten 121-133, XP001010376 das ganze Dokument	26,27, 29-35
A	GAO X ET AL: "CATIONIC LIPOSOME-MEDIATED GENE TRANSFER" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, Bd. 2, Nr. 10, 1. Dezember 1995 (1995-12-01), Seiten 710-722, XP000749400 ISSN: 0969-7128 das ganze Dokument	28
A	WO 95 22611 A (UNIV MICHIGAN) 24. August 1995 (1995-08-24) Seite 7, Zeile 4 - Seite 8, Zeile 13 Seite 8, Zeile 32 - Seite 9, Zeile 13 Seite 10, Zeile 4 - Zeile 25 Seite 11, Zeile 5 - Zeile 23 Seite 12, Zeile 5 - Seite 19, Zeile 22	26-35

THIS PAGE BLANK (150)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05313

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0339607 A	02-11-1989	US 5053050 A	01-10-1991
		US 4904259 A	27-02-1990
		AT 85524 T	15-02-1993
		AU 625913 B	16-07-1992
		AU 3380889 A	02-11-1989
		DE 68904800 D	25-03-1993
		DE 68904800 T	05-08-1993
		ES 2051914 T	01-07-1994
		IL 90075 A	26-08-1994
		JP 2209811 A	21-08-1990
		JP 2858782 B	17-02-1999
		ZA 8903074 A	29-05-1991
WO 9925396 A	27-05-1999	AU 1588099 A	07-06-1999
DE 3410631 A	27-09-1984	IL 68218 A	31-12-1985
		GB 2137209 A, B	03-10-1984
		JP 1839264 C	25-04-1994
		JP 5051306 B	02-08-1993
		JP 59192364 A	31-10-1984
		US 4642120 A	10-02-1987
WO 9603160 A	08-02-1996	AU 3145795 A	22-02-1996
US 5374550 A	20-12-1994	US 5284830 A	08-02-1994
		EP 0572573 A	08-12-1993
		JP 6508111 T	14-09-1994
		WO 9214749 A	03-09-1992
WO 9921497 A	06-05-1999	EP 1027001 A	16-08-2000
WO 9639196 A	12-12-1996	AU 720762 B	08-06-2000
		AU 6152296 A	24-12-1996
		CA 2224176 A	12-12-1996
		EP 0828518 A	18-03-1998
		JP 2000500641 T	25-01-2000
WO 9960951 A	02-12-1999	AU 4093399 A	13-12-1999
EP 0657178 A	14-06-1995	SE 501288 C	09-01-1995
		SE 9303977 A	09-01-1995
		US 5667796 A	16-09-1997
DE 3810803 A	12-10-1989	KEINE	
WO 9522611 A	24-08-1995	US 5763416 A	09-06-1998
		US 5942496 A	24-08-1999
		AT 186327 T	15-11-1999
		AU 698906 B	12-11-1998
		AU 1968695 A	04-09-1995
		CA 2183542 A	24-08-1995
		DE 69513149 D	09-12-1999
		DE 69513149 T	21-06-2000
		DK 741785 T	10-04-2000
		EP 0741785 A	13-11-1996
		ES 2139889 T	16-02-2000
		JP 3054634 B	19-06-2000
		JP 9509825 T	07-10-1997

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 00/05313

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/74741 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61L 27/00

(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzre-
gentenstr. 16, D-80538 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05313

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juni 2000 (08.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 26 083.4 8. Juni 1999 (08.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG
[DE/DE]; Hugstetter Str. 49, D-79106 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHAEFER, Dirk, Jo-
hannes [DE/DE]; Maltererstr. 8, D-79102 Freiburg (DE).
KLEMT, Christof [DE/DE]; Krafftgasse 1, D-79379
Mullheim (DE). STARK, Gerhard, Björn [DE/DE];
Am Rossberg 25, D-79874 Breitenau (DE). FRIEDL,
Hans-Peter [DE/DE]; Hohenzollernweg 7, D-79224
Umkirch (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BIOLOGICAL JOINT CONSTRUCT

(54) Bezeichnung: BIOLOGISCHES GELENKKONSTRUKT

(57) Abstract: The invention relates to a biological joint construct which is at least partially produced in an in vitro manner and which comprises at least one biocompatible supporting material, cartilaginous tissue and osseous tissue, whereby the cartilaginous tissue and osseous tissue are joined to one another in a fixed manner. The invention also relates to a method for producing this joint construct. An additional aspect of the invention is osseous tissue that contains the transfected cells and a method for producing the same. Another aspect of the invention is osseous tissue that contains angiopoietic cells or angiogenic growth factors as well as a method for the production thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein biologisches, zumindest teilweise in vitro hergestelltes Gelenk-konstrukt, das wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial, Knorpelgewebe und Knochengewebe umfasst, wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind. Die Erfindung betrifft ausserdem ein Verfahren zur Herstellung dieses Gelenk-konstrukts. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist Knochengewebe, das transfizierte Zellen enthält, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist Knochengewebe, das gefässbildende Zellen oder angiogene Wachstumsfaktoren enthält, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung.

WO 00/74741 A2



!

!

!

!

Biologisches Gelenkkonstrukt

Die vorliegende Erfindung betrifft ein biologisches Gelenkkonstrukt und Verfahren zu seiner Herstellung sowie Knochengewebe, das transfizierte Zellen enthält und Verfahren zu dessen Herstellung.

Gelenkdefekte können bislang chirurgisch nur durch Gelenkresektion, Gelenkversteifung, alloplastischen Ersatz mit Kunststoff- oder Metallimplantaten bzw. Materialkombinationen daraus, oder durch biologische Implantate behandelt werden. Alloplastische Implantate werden jedoch nicht integriert und lockern sich unter Belastung. Als biologisches Implantat können nur Fremdgewebe, beispielsweise Kniegelenke als sogenannte Allotransplantate verwendet werden. Fremdgewebeverpflanzungen erfordern eine lebenslange Immunsuppression mit Gefahren der Weichteiltumorentstehung. Ein autogener biologischer Ersatz kann bisher nur teilweise durch Einzelkomponenten erfolgen. Neben den bekannten chirurgischen Maßnahmen beinhalten wissenschaftliche Ansätze gegenwärtig die Rekonstruktion kleiner Knorpeldefekte durch eine Knorpelzelltransplantation mit einem Knochenhautlappen (Brittberg-Methode). Es gab verschiedene Ansätze, Einzelkomponenten zu rekonstruieren:

Das US-Patent 5,053,050 beschreibt Zusammensetzungen zur Reparatur von Knorpel oder Knochen, wobei Knorpel- oder Knochenzellen in eine biologische, resorbierbare Trägersubstanz eingebracht werden, welche Serum, Fibrinogen und Thrombin enthält. Die US-Anmeldung 5,041,138 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung einer Knorpelstruktur durch Besiedelung einer Trägersubstanz mit Knorpelzellen. In ähnlicher Weise betrifft die US-Anmeldung 5,786,217 ein Verfahren zur Herstellung eines vielzelligen

Knorpelkonstrukts, worin Knorpelvorläuferzellen auf ein Trägermaterial aufgebracht werden und durch weiteres Kultivieren differenzieren und Knorpelsubstanz bilden. Das US-Patent 5,736,372 beschreibt eine polymere Trägersubstanz, die Chondrozyten enthält und geeignet ist, um in vivo Knorpelstrukturen zu bilden. WO 98/42389 offenbart ein biologisches Material zur Behandlung von Knochen- oder Knorpeldefekten umfassend Periost und knochen- oder knorpelbildende Zellen. WO 97/46665 offenbart ein Implantat umfassend eine in vitro gezüchtete Knorpelschicht, die mit einem Knochenersatzmaterial verbunden ist. Es wird jedoch kein lebendes Knochengewebe offenbart. WO 99/25396 beschreibt ein Mischgewebe enthaltend eine Mischung dissoziierter Chondrozyten und Osteoblasten in und auf einer polymeren Matrix. Es wird somit ein Hybridgewebe offenbart, das weder ein Knochengewebe noch ein Knorpelgewebe ist. WO 96/03160 offenbart eine Suspension enthaltend unter anderem Chondrozyten und Osteozyten und Fibrinogen, die mit einer Thrombinlösung zu einer Zell-Fibrinmatrix umgesetzt werden. EP 0 339 607 offenbart eine Zusammensetzung, die Chondrozyten oder Osteoblasten oder andere Zellen enthalten kann, in Fibrinkleber. DE 195 43 110 offenbart ein steriles Knochenmaterial nativen Ursprungs für die Transplantation, das im wesentlichen frei von Fett, Bindegewebe und Knorpelmasse ist und durch trockene Erhitzung und nachfolgende Dampfsterilisation erhältlich ist. Das Knochenmaterial kann auch in Granulatform vorliegen. Es ist bekannt, daß bestimmte Wachstumsfaktoren die Proliferation von Zellen verschiedenster Art stimulieren können. Die internationale Anmeldung WO 95/22611 beschreibt Verfahren und Zusammensetzungen zum Gentransfer in Knochenzellen in vivo, insbesondere zum Gentransfer von osteotropen Genen, die das Wachstum von Knochenvorläuferzellen in vivo stimulieren sollen.

Bislang sind also erfolgreich lediglich Einzelkomponenten rekonstruiert worden, zum Beispiel Knochen oder Knorpel. Biologische Einzelkomponenten können komplexe, meist osteochondrale Defekte aber nicht ausreichend rekonstruieren.

Ungelöst ist nach wie vor die Rekonstruktion komplexer Gelenkstrukturen bzw. der komplette biologische Gelenkersatz mit Knochen-, Knorpel-, Kapsel- und Bandanteilen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein vorteilhaftes biologisches Gelenkkonstrukt zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße biologische, zumindest teilweise in vitro hergestellte Gelenkkonstrukt gelöst. Im Rahmen dieser Anmeldung bedeutet "in vitro", daß ein Prozeß außerhalb des tierischen oder menschlichen Körpers stattfindet. Dazu zählt auch die sogenannte "ex vivo"-Manipulation von Zellen, also das Kultivieren von isolierten Zellen, ihre Vermehrung und Veränderung. Es handelt sich aber nicht um ein im menschlichen oder tierischen Körper natürlich gewachsenes Gelenkkonstrukt. Das erfindungsgemäße Gelenkkonstrukt umfaßt wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial, Knorpelgewebe enthaltend Chondrozyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz, Knochengewebe enthaltend Osteoblasten und/oder Osteocyten und Knochensubstanz, wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind.

Trägermaterialien sind Materialien, die keine zytotoxischen Effekte besitzen, die die Anhaftung von Zellen ermöglichen und die Proliferation und Differenzierung der Zellen zu gewebesynthetisierenden Zellen erlauben. Weiterhin sollte das Material einen stabilen, physiologischen pH-Wert aufweisen. Zur Analyse dieser Kriterien können folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

Durch Elektronenmikroskopie kann die Oberflächentopographie des Materials analysiert werden und die Anhaftung der Zellen überprüft werden. Stoffwechseltests, beispielsweise der XTT-Test (cell proliferation kit, erhältlich von Roche Diagnostics, Mannheim) liefern eine Aussage über die Proliferation der Zellen durch Messung ihrer Stoffwechselaktivität. Es handelt sich hierbei um einen

Proliferationstest für lebende Zellen, bei dem ein Natrium-Tetrazolium-Carboxanilit, kurz Tetrazoliumsalz (mit der Abkürzung XTT), dem Medium zugegeben wird. XTT entspricht Natrium-Tetrazolium-Carboxanilit. Damit kann ein zytotoxischer Effekt ausgeschlossen werden. Durch histologische Methoden können die gewebetypischen Matrices von Knorpel, Knochen oder Kapsel nachgewiesen werden. Die gewebetypische Matrix kann auch durch immunhistochemische Verfahren bestimmt werden.

Für Knorpelgewebe werden als Trägersubstanz bevorzugt schwammartige Vliese, visköse, gelierende und sich verfestigende Gele oder netzartige Fadengewebe eingesetzt. Als biologische Varianten kommen dabei Fibrin-Thrombin-Komplexe, Kollagengele oder Alginat in Betracht. Als synthetische Materialien sind Kollagen, Hydrogele oder visköse Polymere denkbar. Sollen für Knorpel vliesartige Trägermaterialien verwendet werden, so können als biologische Variante Kollagenvliese und als synthetische Varianten Polylactid, Polyglycolid oder Polyurethan verwendet werden.

Die Trägermaterialien für Knochen weisen in der Regel eine feste, formbare bzw. bearbeitbare, dreidimensionale poröse Struktur auf (Porosität ca. 80-90%), wobei die Poren untereinander verbunden sein können. Die Oberflächentopographie sollte leicht geraut sein. Trägersubstanzen können im wesentlichen aus Kollagen, Calciumphosphat oder Fibrin bestehen. Sie können jedoch auch aus synthetischen Polymeren bestehen. Als Knochen-Trägermaterialien können folgende stabile, dreidimensionale, poröse Materialien verwendet werden: humaner oder animaler spongiöser Knochen, gesinterter Knochen, Korallenmatrix, demineralisierte Knochenmatrix (biologische Varianten), Calciumphosphat-Verbindungen, Polylactid, Polyglycolid, andere Polymere (synthetische Varianten). Als visköse, gelierende und sich verfestigende Gele sind folgende Materialien einsetzbar: Fibrin-Thrombin-Komplexe, Kollagengele, Alginat (biologische Varianten), Hydrogele, visköse Polymere (synthetische Varianten). Die Knochen-Trägermaterialien können weiterhin mit

Haftmolekülen beschichtet sein, die die Anheftung von Zellen erleichtern. Solche Haftmoleküle sind bevorzugt Fibronectin oder Laminin. Wesentlich ist, daß keine Abstoßungsreaktionen gegen die Trägermaterialien in dem Empfängerorganismus auftreten.

Für Kapselkomponenten sind bandförmige Gewebenetze oder Vliese geeignet. Als Trägermaterialien zur Herstellung von Bandkomponenten sind allgemein membranartige synthetische resorbierbare Fasermaterialien einsetzbar, beispielsweise Polyglactin, Polyglycolsäure, Polymilchsäure oder Hyaluronsäure.

Die Trägermaterialien für Bandkomponenten können auch als Trägermaterialien für Kapselkomponenten verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Spongiosa als Trägermaterial der Knochenkomponente. Überraschenderweise wurde gefunden, daß Spongiosa sehr gut geeignet ist, um Knochenvorläuferzellen zur Synthese von Knochensubstanz anzuregen. Vorzugsweise handelt es sich dabei um autoklavierte, humane, allogene Spongiosa, die aus Hüftköpfen gewonnen wird. Am bevorzugtesten wird das Material aus Hüftköpfen gewonnen, die durch Wasserstrahl und Ultraschallbehandlung von losem Stroma gereinigt werden. Anschließend erfolgt Autoklavierung bei 134°C und 2,5 bar zur Sterilisation. Das Material ist steril, nicht immunogen, resorbierbar und besteht aus Hydroxylapatit und denaturiertem Kollagen Typ 1.

Das in dem erfindungsgemäßen Gelenkkonstrukt enthaltene Knorpelgewebe enthält Chondrozyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz. Unter Knorpelgewebe ist ein aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und - verschiedener - Grundsubstanz und verschiedenen Faserarten bestehendes viskoelastisches, gefäß- und nervenloses Stützgewebe zu verstehen. Unter Knorpelsubstanz ist die Grundsubstanz zusammen mit den verschiedenen Faserarten zu verstehen. Die Grundsubstanz

enthält Glycosaminoglykane und Proteoglykane, vorzugsweise Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Weiter sind Proteine und Mineralbestandteile enthalten. Als Faserarten können elastische Fasern, kollagene Fibrillen oder kollagene Fasern vorkommen.

Unter Knochengewebe ist ein Gewebe zu verstehen, das aus Knochenzellen, kollagenen Fasern und einer verkalkten Grundsubstanz besteht. Knochensubstanz im Sinne der Anmeldung umfaßt Kollagen, Glycosaminglykane und Proteoglykane, sowie anorganische Substanzen, hauptsächlich Calciumphosphat, das in Form von Hydroxylapatit-Kristallen auftritt. Zur Verbesserung der Gefäßneubildung kann das Knochengewebe Wachstumsfaktorproteine enthalten oder Osteoblasten, die mit für Wachstumsfaktoren kodierenden Genen transfiziert wurden. Schließlich können auch gefäßbildende Zellen enthalten sein, die die Blutgefäßentstehung fördern (z.B. Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen).

Erfindungsgemäß sind Knorpelgewebe und Knochengewebe des Gelenkkonstrukts fest miteinander verbunden. Dabei ist das Trägermaterial des Knochens mit der neuen Knochensubstanz verzahnt, es ist auch teilweise in die Knorpelkomponente integriert. Es liegt also keine scharfe Trennfläche zwischen Knochen- und Knorpelgewebe vor, vielmehr wird durch Verzahnung und Interdigitation eine feste Verbindung erreicht. Bevorzugt wird dies dadurch erreicht, daß das Knochengewebe eine raue bzw. poröse Oberfläche aufweist, in die das Knorpelgewebe einwachsen kann.

Die in dem Gelenkkonstrukt enthaltenen Knochen- und Knorpelzellen sind vor der Herstellung des Gelenkkonstrukts nach üblichen Methoden isoliert worden. Es können auch Vorläuferzellen isoliert werden, die erst während Kultur in vitro zu Knochen- oder Knorpelzellen differenzieren.

Das biologische Gelenkkonstrukt kann beliebige Größe aufweisen. Damit ist der Teilersatz einer Gelenkfläche, der

Totalersatz einer Gelenkfläche oder der Ersatz eines gesamten Gelenks mit zwei Gelenkflächen möglich.

Beim Teilersatz einer Gelenkfläche (ohne Bandersatz) kann ein einzelnes präformiertes Konstrukt oder osteochondrale Zylinder verwendet werden. Bei Verwendung eines einzelnen präformierten Konstrukts wird ein bestimmter Knorpel/Knochendefekt eines Gelenks durch ein einzelnes osteochondrales Konstrukt ersetzt. Die Form wird dabei durch die Knochenkomponente bestimmt. Nach Zellgewinnung und Herstellung der Komponenten wird das Konstrukt ex vivo präformiert, das heißt es wird anhand individueller Datenerhebung durch Computertomographie oder Magnetresonanzuntersuchungen auf den zu korrigierenden Defekt hin maßgeschneidert. Die Verankerung erfolgt dann durch den Knochenzapfen. Zur Vermeidung einer jeweiligen individuellen Anfertigung eines Konstrukts wie beschrieben können auch uniforme osteochondrale Zylinder angefertigt werden, die im Sinne einer sogenannten Mosaikplastik zu mehreren in einen Defekt eingefügt werden und die Gelenkfläche rekonstruieren. Diese Zylinder können in verschiedenen Größen und Formen angefertigt werden. In jedem Fall bestehen sie aus einer Knorpelschicht und einem Knochenzapfen. Beide Komponenten sind mit der jeweiligen Zellsorte beladen. Die Knochenzellen können auch mit Wachstumsfaktoren transfiziert sein, um zusätzlich die Knochenbildung und Gefäßbildung einzuleiten. Vorzugsweise haben die Zylinder eine Höhe von 5 bis 25 mm und einen Durchmesser von 2,5 bis 15 mm. Die Schichtdicke des Knorpels beträgt vorzugsweise 0,5 bis 2 mm, die des Knochens wird üblicherweise zwischen 3,5 und 23 mm variieren. Als mögliche Formen sind Zylinder mit rundem Querschnitt, mit dreieckigem Querschnitt oder mit mehreckigem Querschnitt (z.B. penta-, hexa-, hepta- oder oktogon) denkbar. Ebenfalls können Quader mit rechteckigem Querschnitt (viereckig) bzw. mit quadratischem Querschnitt verwendet werden. Die Knorpel sind so geformt, daß ihre Oberfläche eine konvexe Krümmung aufweist oder eine plane Oberfläche ohne Krümmung ist. Die Verwendung osteochondraler Zylinder wurde im Kaninchenmodell überprüft und war erfolgreich in der Rekonstruktion eines

osteocondralen Defekts. Der Vorteil der Methode ist die einfachere Herstellung und die mögliche minimal-invasive Anwendung.

Beim Totalersatz einer Gelenkfläche weist das Gelenkkonstrukt vorzugsweise eine anatomisch sinnvolle Form auf, beispielsweise besitzt es eine Gelenkseite, deren Oberfläche aus Knorpelgewebe besteht und die Kontakt zu einem anderen Gelenkteil haben kann, und es besitzt eine Ankerseite, die zum Teil aus Knochengewebe besteht und die zur Verankerung des Konstrukts in einem Knochenschaft dienen kann. Die Ankerseite ist vorzugsweise in der Form eines zylinderförmigen Zapfens ausgebildet, der besonders gut in einem Knochenschaft verankert werden kann. Die Gelenkseite besitzt besonders bevorzugt eine konkave oder konvexe Oberfläche. Es sind aber auch andere Gelenkkonstruktformen denkbar, je nach Art des Gelenks, für dessen Reparatur das Konstrukt verwendet werden soll.

Die erfindungsgemäßen Gelenkkonstrukte können ebenfalls wenigstens eine Bandkomponente aufweisen. Die Bandkomponente besteht beispielsweise aus einem strangförmigen, faserartigen oder membranösen Biomaterial. Sie kann an Bandverbindungsstellen der Knochenkomponente des erfindungsgemäßen Gelenkkonstrukts befestigt werden. Mögliche Befestigungsarten sind biologische Klebung, beispielsweise durch Fibrin-Thrombin-Komplexe, unterstützende, transossäre Naht oder der Durchzug durch die Knochenkomponente in einem Knochenkanal. Beim Totalersatz einer Gelenkfläche ist die Anfertigung von Bandstrukturen nicht unbedingt notwendig, da die vorhandenen Kapsel-Bandstrukturen im Defekt genutzt werden können. Die Knochenkomponente kann Verankerungspunkte für diese Strukturen aufweisen. Dies sind in der Regel Bohrkanäle, durch die Nahtmaterial hindurchgezogen und damit die Kapsel-Bandstrukturen fixiert werden können. Vorzugsweise wird das Knorpel-Knochenkonstrukt ohne zusätzliche Fixierung der Kapsel oder Bänder eingesetzt.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht in einem biologischen Gelenkersatz, der wenigstens zwei Gelenkkonstrukte umfaßt. Zwei Gelenkkonstrukte können dabei mit Ihren knorpelbeschichteten Gelenkseiten Kontakt zueinander haben, während die voneinander abgewandten Ankerseiten in zwei verschiedenen Knochenschäften verankert werden können. Dieser Gelenkersatz wird vorzugsweise weiter durch Anbringung von wenigstens zwei Bandkomponenten stabilisiert. Schließlich kann ein derartiger biologischer Gelenkersatz auch eine Gelenkkapsel aufweisen. Dazu wird ein membranöses Biomaterial an Kapselverbindungsarealen der Knochenkomponente entweder durch biologische Klebung oder durch Naht befestigt. Durch die beschriebene Ausführungsform kann der komplette Ersatz eines Gelenks mit zwei Gelenkflächen erfolgen. Der komplette Gelenkersatz mit zwei Gelenkanteilen ist vor allem bei Arthrose oder Arthritis notwendig und stellt die komplizierteste Form des Gelenkersatzes dar. Prinzipiell werden zwei Gelenkteile bestehend aus Knorpel- und Knochenkomponente hergestellt. Auf einer Seite ist die Gelenkfläche konvex, auf der anderen passend dazu konkav geformt, so daß eine regelrechte Artikulation der Flächen bei Bewegung möglich ist. Die Komponenten werden einzeln hergestellt und können auch einzeln implantiert werden, wie der Totalersatz nur einer Gelenkfläche wie oben stehend beschrieben.

Bevorzugt werden vorhandene Kapseln und Bänder des alten Gelenks benutzt, um die Einzelteile zu verbinden und das neue Gelenk zu stabilisieren. Dazu werden die Bänder durch Nähte, welche durch Bohrkanäle gezogen werden, an der Knochenkomponente fixiert. Die Komponente kann an dieser Stelle eine Vertiefung aufweisen. Alternativ werden die beiden Gelenkteile durch Nahtmaterial miteinander verbunden, bis sich nach der Transplantation eine Neokapsel in vivo gebildet hat. Sollte ein Bandersatz durch Tissue engineering notwendig sein, so kann der Bandersatz wie folgt hergestellt werden. Zunächst werden autologe Fibroblasten aus der Dermis durch eine Hautbiopsie isoliert und in vitro vermehrt. Ein bandförmiges

Biomaterial wird mit einer Zellsuspension ($2,5$ bis 5×10^7 Zellen pro ml Medium) besiedelt. Als Biomaterial kommen beispielsweise Collagenvliese, azelluläre Lederhaut, lyophilisierte Dura oder synthetische Bänder aus PGLA in Betracht. Das Bandkonstrukt wird für 3 bis 7 Tage in vitro gezüchtet. Schließlich wird die Struktur an der Knochenkomponente durch Naht oder Fibrinklebung befestigt. Dabei erfolgt die Fixierung zunächst nur auf einer Gelenkseite, die zweite Verbindung erfolgt erst nach Implantation im Rahmen der Operation.

Alternativ können die Bandstrukturen auch durch die Verpflanzung von Sehnen oder deren Teilen erfolgen, wie es bereits gegenwärtiger Stand der chirurgischen Technik ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstrukts. Dieses Verfahren umfaßt die Bereitstellung einer Knochenkomponente, die Bereitstellung einer Knorpelkomponente, die Verbindung dieser beiden Komponenten sowie die Züchtung des resultierenden Konstrukts in vitro.

Die Bereitstellung der Knochenkomponente erfolgt durch Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit Osteoblasten. Als Trägermaterialien kommen die obengenannten Trägermaterialien für Knochen in Betracht. Vorläuferzellen von Osteoblasten können durch kleine Knochenbiopsien des Beckens, Brustbeines, des Schädels und Kiefers oder von Röhrenknochen gewonnen werden. Aus den Knochenproben wird das lose Stroma herausgespült und nach Zentrifugation in einer Kulturflasche ausplattiert. Die festen Knochenanteile können ebenfalls in Kultur gebracht werden, da hieraus durch Migration weitere Zellen gewonnen werden können. Die auswachsenden Zellen werden im subkonfluenten Stadium gesplittet und zwei- bis dreimal passagiert. Alternativ zu Knochenproben können auch Aspirate von Knochenmark aus dem Becken oder aus dem Brustbein verwendet werden. Hierbei wird der Knochen beispielsweise mit einer Kanüle punktiert, und die Probe wird durch Ansaugen

(Aspiration) erhalten. Die Aspireate werden in Heparinmedium gespült, durch einen Dichtegradienten zentrifugiert, um rote Blutkörperchen abzutrennen und schließlich in einer Kulturflasche ausplattiert. Der osteoblastische Phänotyp der Zellen in Kultur kann durch Nachweis der knochenspezifischen Proteine Alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Kulturmedium überprüft werden. Immunhistochemische Färbungen von Kontrollkulturen sind ebenfalls denkbar. Die Blutversorgung des biologischen Gelenkersatzes durch neugebildete Gefäße ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben der Zellen und das Einheilen des Konstrukts. Aus diesem Grund kann die Knochenkomponente auf drei Weisen modifiziert werden: Sie kann Wachstumsfaktorproteine enthalten, die die Gefäßneubildung induzieren (1), sie kann Osteoblasten enthalten, die mit Wachstumsfaktorgen transfiziert sind (2) oder sie kann gefäßbildende Zellen enthalten, die zur Blutgefäßentstehung führen (3).

Angiogene Wachstumsfaktoren können direkt in rekombinanter Form in der viskösen Matrix der Knochenkomponente in wirksamer Konzentration gespeichert werden. Mögliche Faktoren sind Vascular endothelial growth factor (VEGF) sowie Isoformen davon, Basic fibroblast growth factor (bFGF), Angiopoetin 1 und 2 (Ang I und II). Die Konzentration der Faktoren beträgt üblicherweise 0,1 bis 10 ng/ml visköse Matrix. Der oder die Wachstumsfaktoren können vorteilhaft einer Calciumchlorid-Thrombinlösung zugesetzt werden, die dann zu einer Osteoblastensuspension in Fibrinogenlösung zugegeben wird. Dadurch bildet sich ein dreidimensionales Fibrinnetzwerk mit haftenden Osteoblasten im Kulturmedium und gespeichertem Wachstumsfaktor.

Die Transfektion von Osteoblasten mit gefäßbildenden Wachstumsfaktoren ist ausführlich in einem späteren Teil des Anmeldetextes beschrieben.

Es können auch gefäßbildende Zellen, sogenannte Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen, in die visköse Matrix der

Knochenkomponente eingebracht werden, gemischt mit den Osteoblasten. Mikrovaskuläre Endothelzellen werden aus der Lederhaut (Dermis) eines Patienten isoliert nach einem an sich bekannten Protokoll und mit Endothelzellenmedium in vitro vermehrt (etablierte Technik). Eine Osteoblasten-Fibrinogensuspension wird hergestellt, wobei als Medium sogenanntes Endothelzellmedium verwendet wird, in welchem Osteoblasten gut wachsen können. Die gemischtzellige Osteoblasten-Endothelzell-Fibrinogensuspension wird dann in die poröse, feste Trägermatrix der Knochenkomponente eingesogen bzw. appliziert.

Die drei beschriebenen Strategien können auch kombiniert werden. Beispielsweise kann eine Osteoblasten-Endothelzell-Fibrinogensuspension eingesetzt werden zusammen mit Osteoblasten, die mit Wachstumsfaktorgenen transfiziert wurden. Genauso können Osteoblasten-Endothelzell-Fibrinogensuspensionen gemeinsam mit rekombinanten Wachstumsfaktoren verwendet werden.

Vorzugsweise wird das Knochenträgermaterial durch eine Knochenzellsuspension in einer Aspirationskammer besiedelt. Üblicherweise wird das Knochenträgermaterial vor der Besiedelung durch Knochenzellen in anatomisch sinnvoller Weise geformt. Beispielsweise führt die Formgebung zur Ausbildung einer Gelenkseite, die zur Aufnahme einer Knorpelfläche dienen soll und zur Ausbildung einer Ankerseite, die der Verbindung mit einem Knochenschaft dienen soll.

Chondrozyten werden bevorzugt aus Biopsien von Knorpelgewebe des Ohres, der Rippe und der Gelenke durch enzymatische Auflösung gewonnen. Durch Beimpfung von Biomaterialien wie Kollagenschwämmen und Fibrinkleber können die Zellen organotypisch in einer dreidimensionalen Kultur weiter vermehrt werden. Dadurch wird auch vermieden, daß sich die Zellen zu Fibroblasten entdifferenzieren. Der chondroblastische Phänotyp bleibt erhalten. Zur Bereitstellung der Knorpelkomponente kann nun eine Suspension von

Chondrozyten hergestellt werden entweder in einem flüssigen Medium oder in einem gelartigen Material. Beispielsweise können Knorpelzellen in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert werden und nach Mischen mit der Fibrinogenkomponente in eine bestimmte vorgefertigte Kulturform gegossen werden. Dadurch entsteht ein festes Gebilde, das mit Kulturmedium überschichtet wird und im Brutschrank gezüchtet wird. Alternativ können auch bioverträgliche Trägersubstanzen durch Knorpelzellen besiedelt werden. Beispielsweise werden Schwämme aus Kollagen mit Chondrozyten angeimpft. Die angeimpften Kollagenvliese können im Brutschrank kultiviert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Knochen- und Knorpelkomponente getrennt voneinander hergestellt und getrennt kultiviert. Nachdem die jeweiligen Zellen ausreichend Gewebe gebildet haben, werden Knochen- und Knorpelkomponente durch Fibrinklebung miteinander verbunden. Es ist wesentlich für die Erfindung, daß bei der Verbindung von Knochen- und Knorpelkomponente das Trägermaterial der Knochenkomponente in den Knorpel integriert wird. Das resultierende Konstrukt kann nun in vitro kultiviert werden, so daß die Zellen zur Anheftung und zur Synthese ihrer gewebespezifischen extrazellulären Matrix stimuliert werden, dadurch wird eine biologische Vernetzung der zusammengesetzten Komponenten erreicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Knochen- und Knorpelkomponente nicht separat hergestellt und kultiviert. Vielmehr wird während des Abbindens des Fibrinklebers bei der Herstellung der Knorpelkomponente das Trägermaterial der Knochenkomponente, das noch nicht durch Osteoblasten besiedelt worden ist, in die Knorpelschicht gedrückt, so daß es fest eingebunden wird. Die Besiedelung durch Osteoblasten erfolgt erst später.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfaßt auch die Herstellung einer Bandkomponente aus faserartigen Materialien und Fibroblasten. Dabei können Fibroblasten aus Suspension auf

bandförmige Materialien geimpft werden und im Brutschrank kultiviert werden. Ähnlich dazu können Ausführungsformen die Herstellung auch einer Kapselkomponente aus faserartigen, membranösen Materialien und Fibroblasten umfassen.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren das Anbringen von Bandverbindungsstellen oder Kapselverbindungsarealen an dem Trägermaterial der Knochenkomponente umfassen. Daran können Gelenkbänder bzw. Kapselkomponenten befestigt werden. Bandkonstrukte werden bevorzugt dadurch mit der Knochenkomponente verbunden, daß das Bandkonstrukt durch einen Bohrkanal in der Knochenkomponente hindurchgezogen wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe, wonach Knochen- oder Knochenvorläuferzellen isoliert werden, diese Zellen durch nicht-viralen Gentransfer mit einem Wachstumsfaktorgen transfiziert werden und zur Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials benutzt werden. Das entstehende Konstrukt wird schließlich in vitro weitergezüchtet. Gegebenenfalls werden die isolierten Zellen vor der Transfektion in vitro vermehrt. Die Transfektion kann stabil sein, bevorzugt ist jedoch eine transiente Transfektion. Bei der transienten Transfektion werden die Zellen nur vorübergehend, also nicht dauerhaft durch die Einschleusung von DNA genetisch verändert. Die Transfektion kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Beim Partikel-vermittelten Gentransfer werden Zellen durch eine sogenannte Genkanone (gene gun) mit Plasmid- oder nackter DNA-beschichteten Goldpartikeln beschossen. Alternativ dazu kann die Transfektion durch Elektroporation vorgenommen werden. Die bevorzugte Transfektionsmethode ist jedoch die Lipofektion. Bevorzugt werden dabei die Reagenzien Transfectam[®] (erhältlich von der Firma Promega), Fugene[®] (erhältlich von der Firma Roche Diagnostics), Lipofectamin 2000[®], Lipofectin[®] (Firma Life Technology) und Escort[®] (erhältlich von der Firma Sigma) verwendet.

Erfindungsgemäß werden die Zellen mit wenigstens einem Wachstumsfaktorgen transfiziert. Ein Wachstumsfaktor oder Cytokin im Sinne der Erfindung ist eine Verbindung, die die Proliferation und/oder Differenzierung von Zellen stimulieren kann. Die meisten Wachstumsfaktoren sind Proteine oder Peptide, so daß Gene, die für diese Proteine oder Peptide kodieren, transfiziert werden können. Bevorzugt sind diese Gene in Plasmide eingebaut, die zusätzliche regulatorische und Kontrollsequenzen enthalten, um die Expression des Gens zu gewährleisten. Zu diesen zusätzlichen Sequenzen zählen ein Replikationsursprung, eine Promotorsequenz, am bevorzugtesten abgeleitet vom Cytomegalievirus (CMV), gegebenenfalls eine Kozaksequenz (eine nahe am Promotor lokalisierte DNA-Sequenz, die die Expression erhöhen soll), ein Polyadenylierungssignal, gegebenenfalls ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelt. Gemäß der Erfindung können auch Nucleinsäuren transfiziert werden, die nur für ein Fragment eines Wachstumsfaktors kodieren, das aber die Aktivität eines Wachstumsfaktors besitzt.

Mögliche Wachstumsfaktoren, deren Gene transfiziert werden können sind "basic fibroblast growth factor" (bFGF), "insuline-like growth factor" (IGF I, II), "platelet derived growth factor" (PDGF-AA, -AB, -BB), "bone morphogenetic proteins" (BMP-1 bis BMP-20), "vascular endothelial growth factor" (VEGF), Faktor XIII (F XIII), "transforming growth factor β " (TGF- β), Angiopoetin (Ang I, II) und andere osteotrope Faktoren. Bevorzugt wird jedoch das Gen transfiziert, das für epidermalen Wachstumsfaktor kodiert (EGF).

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das bioverträgliche Trägermaterial nicht nur mit transfizierten Zellen, sondern auch mit nicht transfizierten Zellen in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:9 (transfizierte zu nicht-transfizierten Zellen) besiedelt. Die isolierten Zellen können verschiedene Knochenzellen oder Knochenvorläuferzellen sein, bevorzugt sind es jedoch stromale Zellen.

Außerdem betrifft die Erfindung Knochengewebe, das wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial und Osteoblasten enthält, die in vitro durch nicht-viralen Gentransfer mit einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor kodiert, transfiziert worden sind. Bevorzugte Ausführungsformen betreffen Knochengewebe, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe mit Hilfe von transfizierten Zellen hergestellt wurden.

Das erfindungsgemäße Knochengewebe hat zwei wesentliche Vorteile.

Zum Einen werden nicht-transfizierte Zellen durch die sezernierten Wachstumsfaktoren parakrin zur Proliferation angeregt. Dabei wird der Wachstumsfaktor von einer Zelle produziert und wirkt auf eine andere Zelle ein. Das hat nicht nur eine verbesserte Besiedelung der Trägermaterialien während der in vitro-Phase zur Folge, sondern auch eine verbesserte Einbindung des Gewebes nach Implantation. Das Knochengewebe stellt dann in vivo Wachstumsfaktoren zur Verfügung, ist also ein "zelluläres Wachstumsfaktor-Liefersystem". Dabei treten die von anderen Verfahren bekannten Nachteile nicht auf: Es werden keine Zellen außer den gewünschten transfiziert. Es sind keine Risiken zu befürchten, die mit viralen Methoden einhergehen. Es müssen nicht wiederholt Dosen von rekombinantem Wachstumsfaktorprotein appliziert werden, da die Sekretion "physiologisch" erfolgt. Bei direkter Gabe von Wachstumsfaktor bestehen auch die Risiken biologischer Inaktivität oder mangelnder Reinheit des Proteins.

Der zweite wesentliche Vorteil besteht darin, daß bestimmte Wachstumsfaktoren nach Implantation des Gewebes eine Gefäßneubildung induzieren können. Die Gefäßneubildung ist eines der entscheidenden Probleme beim "TissueEngineering". Die Faktoren können somit zu einer verbesserten Vaskularisierung des Konstrukts führen, was ein wesentlicher Vorteil für die Eigenschaften des implantierten Gewebes ist.

Figur 1a) zeigt die Fusion der Knorpelkomponente mit dem Trägermaterial des Knochens. Während dem Verfestigungsvorgang der Knorpelkomponente wird das Trägermaterial der Knochenkomponente in das Knorpelkonstrukt eingedrückt.

Figur 1b) zeigt das Anbringen der Bandkomponenten. Biologische Bandkomponenten können an den Bandverbindungsstellen integriert werden (hier durch transossären Durchzug). Das Konstrukt hat eine Gelenkseite und eine Ankerseite für den Einbau in den Knochen.

Figur 1c) zeigt Ansichten eines Knorpel-Knochen-Konstrukts. Das Trägermaterial der Knochenkomponente wurde mit Osteoblasten besiedelt. Die Knorpelkomponente ist fest mit der Knochenkomponente Verbunden. Das Konstrukt hat eine anatomisch korrekte Form zum Gelenkersatz. Es weist eine Gelenkseite und eine Ankerseite auf.

Figur 1d) zeigt die Integration des biologischen Gelenkkonstrukts in den Knochen. Darstellung eines einseitigen Gelenkersatzes durch Einbau eines Knorpel-Knochen-Konstrukts ohne Bandverbindung in den Knochen.

Figur 1e) zeigt die Integration eines kompletten Gelenkersatzes mit Bandverbindung. Ein zweiteiliger Gelenkersatz wurde mit Bandverbindung in Knochen nach Entfernung des ursprünglichen Gelenks (hier Fingergrundgelenk) eingesetzt. Der biologische Gelenkersatz hat die korrekte anatomische Form.

Figur 1f) zeigt ein histologisches Schema nach Fusion der Knorpelkomponente mit dem Knochenträgermaterial. Das Trägermaterial der Knochenkomponente (hier Spongiosa) wurde während dem Verfestigungsvorgang der Knorpelzellsuspension (hier Fibrinkleber) in das Knorpelkonstrukt integriert. Es entsteht eine stabile Verbindung zwischen Knorpelschicht und Trägermaterial des Knochens.

Figur 1g) zeigt ein histologisches Schema eines Knorpel-Knochen-Konstrukts nach Synthese von Knochensubstanz durch Osteoblasten. Nach Besiedelung des in Figur 1f) gezeigten Konstrukts mit Osteoblasten wurde neue Knochensubstanz synthetisiert.

Figur 1h) zeigt ein histologisches Schema der Grenzfläche zwischen Knorpel und Knochen. Die Vergrößerung zeigt im Schema die Grenzfläche zwischen der Knorpel- und Knochenkomponente mit dem Trägermaterial des Knochens. Es zeigt sich die Verzahnung des Trägermaterials mit der neuen Knochensubstanz und die Vernetzung des Knorpels mit dem Knochen. Das Trägermaterial ist teilweise in die Knorpelkomponente integriert.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele näher erläutert, wobei Tierversuche die Durchführbarkeit der vorliegenden Erfindung belegen müssen, da Experimente am Menschen aus ethischen Gründen nicht vertretbar erscheinen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind aber bevorzugt biologische Gelenkkonstrukte, die autologe, also vom Empfänger stammende oder allogene, das heißt von einem anderen Menschen stammende Zellen enthalten.

Beispiel 1: Isolierung von Chondroblasten

Es wird zunächst die Isolierung von Chondroblasten aus Kaninchen beschrieben. Diese Methode ist im Prinzip auf Menschen übertragbar.

Das Kaninchen wird durch eine Injektion narkotisiert. Die Haare werden im Operationsgebiet rasiert, die Haut desinfiziert und steril abgedeckt. Über dem knorpeligen Anteil der Rippe wird ein Schnitt von ca. 2 cm gesetzt. Der Rippenanteil wird freipräpariert, etwa 1,5 cm Rippenknorpel einschließlich des Perichondrium werden herausgetrennt. Nach

Blutstillung und Spülung wird die Wunde durch Rückstichnähte verschlossen. Anschließend wird ein Sprühverband angebracht.

Der autologe Rippenknorpel wird in sterile Ringerlösung (DAB 7-Lösung, erhältlich von Fa. Delta Pharma) gegeben, die mit 200 IU/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin supplementiert worden ist. Der Knorpel kann in der Lösung für einige Stunden bei 4°C aufbewahrt werden, muß aber innerhalb von 6-8 Stunden bearbeitet werden. Das Knorpelgewebe wird mit einem Skalpell (20/22) unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von 1-2 mm zerkleinert und in eine große Petrischale (130 × 15 mm) gegeben. Die Knorpelmenge wird gewogen.

Anschließend werden 50 ml 2 mg/ml Kollagenase in einem handelsüblichen, speziell für Chondrozyten hergestellten Standardmedium, nämlich HAM's F12-Medium (Hepes-Modifikation, mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in die Petrischale mit den Knorpelstückchen gegeben. Es folgt für 16-24 h Inkubation im Zellkultur-Brutschrank.

Die Knorpelzellsuspension mit verbliebenen Knorpelstückchen wird abpipettiert, mit dem gleichen Volumen HAM's F12-Medium (Hepes-Modifikation), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, ≈50 µg/ml Ascorbinsäure, ≈10% (v/v) autologes Serum, 2 mM Glutamin verdünnt und ausgiebig auf einem Schüttler gerüttelt, um die angedauten Knorpelstücke zu trennen. Dieser Schritt wird am besten in verschlossenen 50 ml-Zentrifugen-Schraubgefäßen durchgeführt.

Die Zellsuspension wird durch Zellfilter in 50 ml-Schraubgefäße filtriert (ca. 25 ml pro Gefäß) und mit o. g. HAM's F12-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen werden 3-4 mal mit 30 ml PBS durch Zentrifugation (10 min, 500 g, 21°C) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in 30 ml Medium aufgenommen.

Um die Zellzahl zu bestimmen, werden zunächst 0,5 ml einer 0,4% Trypanblaulösung in ein Teströhrchen gegeben. Nach Hinzufügen von 0,3 ml HBSS (Hanks Salzlösung) und 0,2 ml Zellsuspension wird sorgfältig gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird durch Zählung mit einem Hämozytometer die Zellzahl ermittelt.

Beispiel 2: Isolierung von Osteoblasten

Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, erstens die offene Knochenbiopsie (als Migrations- oder stromale Zellkultur) und zweitens die Aspiration von Knochenmark.

a) Knochenmarkbiopsie

Nach örtlicher Betäubung und einem kleinen Hautschnitt wird eine sterile Knochenbiopsie durch einen Hohlbohrer entnommen. Es werden Spongiosablöckchen von 0,5 bis 1 cm³ herausgebohrt. Anschließend wird die Wunde verschlossen. Alternativ dazu können auch 15 ml Knochenmark aspiriert werden. Die Spongiosa sollte sehr schnell weiterverarbeitet werden, wenn möglich nicht länger als 12 Stunden im Transportgefäß bei 4°C lagern. Das Medium wird verworfen, die Spongiosa in die Petrischale gegeben und dort in 2 bis 3 mm kleine Partikel ("Chips") zerkleinert.

Migrationskultur:

Es werden 3 bis 4 Partikel in eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 6 Vertiefungen verteilt und mit 3 ml Medium aufgefüllt, bzw. 6 bis 7 Partikel pro 25 cm² Wachstumsfläche mit 7 ml Medium. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Zweimal pro Woche sollte das Medium gewechselt werden, dabei werden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop inspiziert. Nach 5 bis 9 Tagen sind erste Zellen zu erkennen, nach 10 bis 14 Tagen ein subkonfluenten Zellrasen mit 65 bis 75% Bodenflächenbedeckung.

Stromale Zellkultur:

Zunächst wird der Knochen von Muskel- und Bindegewebsresten befreit. Mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette wird die Spongiosa in möglichst kleine Stückchen zerkleinert. Die Spongiosa-Fragmente können in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß gegeben und darin gewogen werden. Enthält das Material viel rotes Knochenmark, so kann man später pro 4 bis 6 g Spongiosa eine 75 cm² Gewebekulturflasche beschicken. In das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß werden nun zur zerkleinerten Spongiosa circa 25 ml Medium 1 (Basalmedium mit Antibiotika, z.B. Medium 199, Fa. Gibco, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) gegeben und durch Vortexen (hochfrequentes Rütteln, circa 30 Sekunden, höchste Stufe) die Zellen herausgelöst. Der Überstand wird in andere Schraubgefäße überführt. Dieser Schritt wird so lange wiederholt, bis das Medium nach Vortexen nicht mehr trüb wird. Zuletzt kann noch eine Trypsin- (und/oder Kollagenase-) Behandlung (circa 10 Minuten, 37°C) durchgeführt werden, um weitere Zellen zu gewinnen. Die erhaltenen Zellsuspensionen werden 10 Minuten bei 250g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, die Zellpellets in Medium resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt. Die gespülten Knochenstückchen können gegebenenfalls in einer separaten Kulturflasche zur Anzüchtung restlicher Zellen verwendet werden (nach Trypsinisierung sind diese aber gut mit Medium zu spülen).

Um die Zellzahl zu bestimmen werden nach der Resuspension der Zellpellets 50 µl der Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 46 µl Trypanblau gemischt. Durch Zugabe von 4 µl Essigsäure werden die Erythrocyten lysiert. Die kernhaltigen Zellen werden in einer Neubauer-Zellkammer (Glaskammer zum Zählen von Zellen unter dem Mikroskop) ausgezählt. Anschließend werden etwa 10⁷ Zellen der Zellsuspension pro 75 cm² Kulturflasche verteilt. Der Mediumwechsel erfolgt nach circa 5 Tagen, später zweimal pro

Woche. Erste ahärente Zellen sind am zweiten Tag erkennbar, Kolonien ab Tag 4 bis 5. Subkonfluenz wird zwischen Tag 9 und 11 erreicht.

b) Isolierung und Selektion der Knochenvorläuferzellen aus Knochenmarkaspirat

Nach örtlicher Betäubung wird eine sterile Knochenmarkpunktion durchgeführt. Durch Aspiration mit einer großvolumigen Kanüle und einer Heparin-benetzten Spritze werden etwa 15 bis 20 ml Blut aus dem hinteren Beckenkamm entnommen. Die Probe wird bei etwa 400 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 5 ml serumfreien Medium 1 suspendiert. Anschließend wird eine Dichtegradientenzentrifugation über einen 70%-Percollgradienten (Percoll ist der Handelsname einer viskösen Lösung mit einer erhöhten Dichte gegenüber Wasser) oder einem Ficoll-Kissen (Ficoll ist eine visköse Lösung mit einer höheren Dichte als Wasser, die chemische Zusammensetzung unterscheidet sich von Percoll, wirkt jedoch nach dem gleichen Prinzip. Beide Lösungen werden zur Dichtezentrifugation benutzt.) bei 400 g für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt, um die Roten Blutkörperchen von den Mesenchymalen Zellen zu trennen. Schließlich werden die Mesenchymzellen in einer Gewebekulturflasche ausplattiert und vermehrt.

Der osteoblastische Phänotyp der Zellen kann durch Nachweis der knochenspezifischen Proteine Alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Kulturmedium oder durch immunhistochemische Färbungen von Kontrollkulturen nachgewiesen werden.

Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen. Pro Ansatz einer Gewebekulturschale mit sechs Vertiefungen werden 2 ml alkalische Phosphatase-Substratpuffer zugegeben (Rotipuran®, Fa. Roth, 50 mM Glycin, 1 mM MgCl₂, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, pH 10,5). Es wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit kann von 5 bis 20 Minuten

variiert werden. Anschließend wird die inkubierte Pufferlösung in einer Küvette 1:1 mit 1 M NaOH gemischt. Schließlich wird die Absorption bei 405 nm bestimmt. Die Enzymaktivität wird angegeben als Absorption/Zellzahl.

Osteocalcinfärbung

Nach Entfernung des Mediums werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit der Lösung A des FIX & PERM-Kit (Handelsname eines Kits, mit dem Zellen fixiert und die Membran permeabilisiert werden kann, so daß Farbstoffe und Eiweiße in das Zellinnere eindringen können. Cell Permeabilisation Kit, Fa. AN DER GRUB, erhältlich von Fa. Dianova) für 15 Minuten fixiert, die Lösung wird anschließend abgesaugt. Lösung B des FIX & PERM-Kit wird zusammen mit dem Primärantikörper (rabbit anti human osteocalcin, Fa. PAESL + LOREI; 1:25 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:1 für 2,5 Stunden lichtgeschützt auf den Monolayer pipettiert, danach wird zwei- bis dreimal mit PBS gespült. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (FITC - conjugated goat and rabbit IgG, Fa. Sigma, 1:80 in PBS) erfolgt lichtgeschützt für eine Stunde. Der Primärantikörper erkennt nach dem Schlüssellock-Prinzip ein bestimmtes Epitop. Der Sekundärantikörper erkennt dann bestimmte Domänen des gebundenen Primärantikörpers. Im Anschluß wird zwei- bis dreimal mit PBS gespült. Anschließend werden die Zellen sofort mit einem Immunfluoreszenzmikroskop mit eingestellter FITC-Anregung untersucht.

Alkalische Phosphatasefärbung

Zur Färbung wurde ein Kit der Fa. Sigma Diagnostics, Katalog Nr. 86-R verwendet. Zunächst werden folgende Lösungen hergestellt: Die Fixierlösung entsteht durch Mischen von 65 ml Aceton, 25 ml "Citrate Solution" und 8 ml 37% Formaldehyd. Die Lösung ist in einer Glasflasche bei 4°C bis zu vier Wochen haltbar. Die "Diazonium Salt Solution" wird durch Mischen von jeweils 1 ml "FRV Alkaline Solution" und "Sodium Nitrite Solution", 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe

des Gemisches zu 45 ml H₂O hergestellt. Schließlich stellt man die "Alkaline Dye Mixture" durch Zugabe von 1 ml "Naphthol AS-BI Alkaline Solution" zu obiger "Diazonium Salt Solution" her (vor Licht schützen). Die Fixierlösung wird auf Raumtemperatur gebracht, dann werden die Zellen 30 Sekunden fixiert. Anschließend werden die Zellen 45 Sekunden mit H₂O gespült, es ist darauf zu achten, daß die Zellen nicht austrocknen. In der Folge inkubiert man die Zellen 15 Minuten mit "Alkaline Dye Mixture" bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wird 2 Minuten mit H₂O gespült. Die Gegenfärbung erfolgt mit "Hämatoxyline Solution". Hämatoxylin ist ein Farbstoff, der Gewebe bei der mikroskopischen Untersuchung rot anfärbt. "Hämatoxyline Solution" wird aufgetropft und 2 Minuten auf den Zellen belassen, dann wird gut mit Wasser gespült. Die Zellen werden an der Luft getrocknet und können unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

Beispiel 3: Isolierung von Fibroblasten

Ein Stück Hautgewebe wird von Fettgewebe befreit und in etwa 0,5 cm² große Stücke geschnitten. Die Hautstücke werden in 2,5 U/ml Dispase entweder 3 h bei 37°C oder 16 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Epidermis abgezogen und verworfen. Die Stücke werden mit einem Skalpell so gut wie möglich zerkleinert. Der entstehende Brei wird dann mit einer Enzymlösung, enthaltend ca. 90 U/ml Kollagenase und ca. 140 U/ml Hyaluronidase versetzt und 3 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird der Brei bei 300 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Bodensatz in 5 ml Medium 2 (Medium 1, 10% (v/v) Serum; bei therapeutischem Einsatz wird autologes, humanes Serum verwendet, bei Experimenten fötales Kälberserum, erhältlich von Fa. Gibco) aufgenommen und in eine 25 cm²-Gewebekulturflasche gegeben.

Sollten noch viele unverdaute Stücke vorhanden sein, wird der Bodensatz anstatt in Medium in 5 ml ca. 185 U Kollagenase/ml Pufferlösung aufgenommen, in eine 25 cm²-Kulturflasche gegeben

und über Nacht in einem Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kollagenase-haltige Suspension abgenommen, zentrifugiert, der Bodensatz in Medium 2 aufgenommen und in dieselbe Flasche zurückgegeben.

Beispiel 4: Herstellung der Knorpelkomponente

a) Kollagenschwämme

Die Zellsuspension wird auf etwa 3×10^7 Zellen/ml eingestellt. Kollagenvliese werden in etwa 1×1 cm große Stückchen geschnitten (steril). Die Vliese werden mit einer Insulinspritze beimpft. Dabei reichen 2 ml Zellsuspension für 8 bis 10 Kollagenstückchen aus. Nach drei Stunden im Brutschrank werden die Stückchen auf eine Gewebekulturplatte mit sechs Vertiefungen verteilt und mit jeweils 8 ml Nährmedium aufgefüllt. Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt.

Tierversuch:

Primäre Rinder-Chondrozyten wurden als Suspension in Schwämme aus Rinder-Kollagen Typ 1 geimpft. Die Konstrukte wurden sieben Tage bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert und anschließend Nacktmäusen subkutan implantiert. Kontrollgruppen waren Kollagenschwämme ohne Zellen und Chondrozytensuspensionen ohne Trägermaterial. Die Explantation erfolgte nach drei, sechs und neun Wochen. Die Konstrukte wurden histologisch-immunhistochemisch untersucht. Die biomechanische Prüfung erfolgte durch einen "confined compression test" zur Bestimmung der hydraulischen Permeabilität und des Kompressionsmoduls (Biomechanisches Testverfahren, bei dem auf eine zu prüfende Probe definierte, zyklische Drücke ausgeübt und Kraftrelaxationsmessungen durchgeführt werden). Als Ergebnis zeigte sich morphologisch hyaliner Knorpel mit immunhistochemischem Nachweis von knorpeltypischem Kollagen Typ 2. In den Kontrollen wurde der leere Kollagenschwamm drei Wochen resorbiert. Die

Zellsuspension entwickelte nur kleine Knorpelstücke. Die Steifigkeit der Konstrukte nahm im zeitlichen Verlauf zu (1,99 Mpa in Woche 9), war jedoch gegenüber nativem Knorpel (5,25 Mpa) verringert. Die hydraulische Permeabilität zeigte signifikant höhere Werte als die Kontrolle ($2,69 \times 10^{-14}$ gegenüber $3,0 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$).

b) Fibrinsuspension

Die Knorpelzellen werden gelöst und nach Zentrifugation in der Thrombinkomponente eines Zweikomponentenfibrinklebers in einer Dichte von $2-3 \times 10^7$ Zellen/ml eingebracht. Anschließend wird durch synchrones Spritzen mittels einer Doppelspritze die zellhaltige Thrombin- mit der Fibrinogenkomponente vermischt und in eine vorgefertigte Kulturform gegossen. Es entsteht durch Präzipitation des Fibrinogen zu Fibrin ein fester "Clot". Schließlich wird mit HAM's F12-Medium (Hepes-Modifikation, Zugabe von Hepes-Pufferlösung zu einem Nährmedium) überschichtet und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tierversuch:

Primäre Chondrozytenkulturen werden aus Rippenknorpelbiopsien etabliert und mit einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert. Anschließend wird durch eine Doppelspritze die Fibrinogenkomponente mit der chondroblastenhaltigen Thrombinkomponente (4 IE Thrombin/ml) zusammengebracht und in eine strukturierte, anatomisch angepaßte Form gegossen. Der Fibrinkleber verfestigt sich in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration innerhalb von 5-10 Minuten in der gewünschten Form.

Tierversuch:

Die Konstrukte wurden Nacktmäusen subkutan implantiert. Kontrollgruppen wurden "Fibrinclots" ohne Zellen und Chondrozytensuspensionen ohne Fibrin implantiert. Die

Explantation erfolgte nach drei, sechs und neun Wochen. Die Konstrukte wurden histologisch-immunhistochemisch untersucht. Die biomechanische Prüfung erfolgt durch einen "confined compression test" zur Bestimmung der hydraulischen Permeabilität und des Kompressionsmoduls.

Als Ergebnis fanden sich in der Gruppe mit Knorpelzellen in Fibrinkleber mikroskopisch neu gebildetes Knorpelgewebe, in den Kontrollgruppen war kein Knorpelgewebe zu finden. Histologisch zeigten die Knorpelkonstrukte die Morphologie von hyalinem Knorpel mit immunhistochemischem Nachweis von Kollagen Typ 2. Die Knorpelkonstrukte zeigten bei der biomechanischen Prüfung im "confined compression test" eine Steifigkeit (Kompressionsmodul) von 0,59 Mpa und eine hydraulische Permeabilität von $1,03 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$.

Beispiel 5: Herstellung der Knochenkomponente

a) Herstellung der Zell-Biomaterialkonstrukte

Die Trägermaterialien werden eine Woche vor Besiedelung mit Zellen in Kulturmedium gewässert, um eine Rehydrierung und pH-Stabilität zu erreichen.

Durch Trypsinisierung werden die als Monolayerkultur gezüchteten Zellen aus der Kulturschale abgelöst und nach Zentrifugation und Zählung in einem geringen Volumen als Einzelzellsuspension suspendiert. Das Medium wird abgenommen, ein Teil in ein 1,8 ml-Kryoröhrchen abgefüllt und eingefroren, der Rest wird verworfen. Aus den Überständen wird mittels eines Enzyme-Linked-Immuno-Sorbence-Assay (ELISA) Osteocalcin und alkalische Phosphatase bestimmt. In einer Gewebekulturplatte mit sechs Vertiefungen wird mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37°C; 0,025% Trypsin) pro Vertiefung das restliche Medium abgespült. Anschließend werden mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Vertiefung die Zellen vom Boden gelöst. Das Trypsin sollte nicht länger als fünf bis acht Minuten auf den

Zellen verbleiben, um irreversible Schädigung zu vermeiden. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst haben, wird mit 1 ml serumhaltigem Kulturmedium 2 neutralisiert (vorgewärmt). Die Zellsuspension wird in einem Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß gesammelt und bei ca. 300g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml flüssiger oder visköser Lösung suspendiert und ausgezählt.

Die flüssige oder visköse Zellsuspension wird in einer Aspirationskammer in die dreidimensionalen Trägermaterialien durch Unterdruck ohne Volumenverlust eingezogen, so daß die gesamte innere Oberfläche besiedelt wird.

b) Ex vivo-Züchtung der Konstrukte

Die Zell-Biomaterialkonstrukte werden in eine spezielle sterile Perfusionskammer gebracht und eingespannt, so daß ein unidirektioneller Durchfluß des Kulturmediums gewährleistet ist. Neben der Zufuhr von immer frischem Medium werden die Zellen durch den Flüssigkeitsstrom mechanisch stimuliert. Das Kulturmedium (Osteoblastenmedium, z.B. BGJ-B-Medium, Fa. Gibco, mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% (v/v) Serum; bei therapeutischem Einsatz wird autologes, humanes Serum verwendet, bei Experimenten fötales Kälberserum) wird durch Zusatz von 10^{-8} bis 10^{-10} M Dexamethason, 50 µg/ml Vitamin C und 40 ng/ml Vitamin D3 im zuführenden Teil angereichert, um die Zellen zur Matrixsynthese zu stimulieren.

c) Analyse der Konstrukte in der Kulturphase

Zur Messung des Zellmetabolismus wird den Konstrukten ein Tetrazoliumsalz "XTT" zugesetzt. Der Test beruht auf der kolorimetrischen Biotransformation des Salzes zu dem intensiv gelb gefärbten Formazan in den Mitochondrien. Die Formazankonzentration wird zu bestimmten Zeitpunkten nach der Zugabe der Lösung photometrisch bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Das Ergebnis korreliert mit dem Zellmetabolismus

bzw. der Proliferation der Zellen (Cell Proliferation Kit, Firma Roche Diagnostics, Mannheim).

Die Adhäsion kann durch "Environmental Scanning Electron Microscopy" (ESEM) kontrolliert werden. Die "Environmental Scanning Electron Microscopy" ist ein technisches Verfahren der Elektronenmikroskopie, bei dem Zellen nicht fixiert werden müssen, sondern lebend im Kulturmedium durch Elektronenmikroskopie betrachtet werden können. 48 Stunden nach Besiedelung der Biomaterialien werden die Konstrukte auf einen Träger geklebt und in eine ESEM-Kammer (Freiburger Materialforschungsinstitut) gebracht. Hiermit kann in der Vergrößerung eines Elektronenmikroskopes die Anhaftung der Zellen auf der Materialoberfläche dargestellt werden.

d) Analyse der Konstrukte am Ende der Kulturphase

Nach zwei bis vier Wochen in der Perfusionskammer werden die Konstrukte fixiert und durch die klassische HE-Färbung histologisch auf eine neue Matrixbildung auf den Trägermaterialien untersucht. Durch die spezielle Richardson-Levaletzko-Färbung wird neues Knochengewebe intensiv blau angefärbt.

Durch Immunhistochemie wird Kollagen 1 als organischer Hauptbestandteil des Knochengewebes nachgewiesen (z.B. durch die Avidin-Biotin-Methode).

Durch Immunfluoreszenz mit FITC-markierten Antikörpern wird Osteocalcin als spezifischer Knochenmarker in dem neuen Gewebe dargestellt.

e) Zusatz angiogener Wachstumsfaktoren zur Knochenkomponente (optional)

Zur Induktion der Gefäßneubildung können Wachstumsfaktorproteine (VEGF, bFGF, Ang I oder Ang II) der Knochenkomponente zugesetzt werden. Zunächst wird wie in

Beispiel 2 beschrieben eine Osteoblastenzellkultur etabliert. Die subkonfluenten Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche werden mit 1 ml 0,025% Trypsin/EDTA-Lösung 5 Minuten trypsinisiert. Nach Resuspension in 2 ml Medium mit 10% FCS und 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 Upm und 4°C werden die Zellen in 100 µl Medium resuspendiert und gezählt. 20000 Osteoblasten der Zellpassage 1 bis 3 werden in 200 µl Fibrinogenlösung suspendiert (66 mg Fibrinogen in 1 ml αMEM oder Medium 199 oder BGJ-B-Medium ohne Serum mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin gelöst; 0,1 bis 10% ε-Amino-n-capronsäure). Anschließend werden 40 µl einer 40 mM Calciumchloridlösung enthaltend 1,25 I.E. Thrombin/ml und 0,1 bis 10 ng/ml rekombinanten Wachstumsfaktor zur Osteoblasten-Fibrinogensuspension gegeben. Das Gemisch wird anschließend in eine Zellkulturschale gespritzt (beispielsweise 48 Well Platte). Nach Zugabe von 760 ml Kulturmedium BGJ-B mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin wird das Zellkonstrukt im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte kultiviert.

f) Herstellung einer Osteoblasten-Endothelzell-Fibrinogensuspension OEFS (optional)

Eine Osteoblasten-Zellkultur wird wie in Beispiel 2 beschrieben etabliert. Die subkonfluente Osteoblastenkultur in einer 75 cm² Zellkulturflasche wird mit 1 ml 0,025% Trypsin/EDTA-Lösung 5 Minuten trypsinisiert. Nach Resuspension in 2 ml Endothelzellmedium ohne Serum und 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 Upm und 4°C werden die Zellen in 100 µl Endothelzellmedium resuspendiert und gezählt. 1 bis 10 x 10⁴ (vorzugsweise 20000) Osteoblasten der Zellpassage 1 bis 3 werden in 200 µl Fibrinogenlösung suspendiert (66 mg Fibrinogen in 1 ml Endothelzellmedium mit 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 0,1 bis 10% ε-Amino-n-capronsäure). Parallel dazu wird eine Endothelzellkultur nach Standardprotokoll als mikrovaskuläre Endothelzellkultur etabliert. Die subkonfluente Endothelzellkultur in einer

75 cm² Kulturflasche wird mit 1 ml 0,025% Trypsin/EDTA-Lösung 5 Minuten trypsinisiert. Nach Resuspension der Zellen 2 ml Endothelzellmedium ohne Serum und 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 Upm und 4°C werden die Zellen in 100 µl Endothelzellmedium resuspendiert und gezählt. 1 bis 10 x 10⁴ (vorzugsweise 20000) Endothelzellen der Zellpassage 1 bis 3 werden in 200 µl der oben genannten Fibrinogenlösung suspendiert. Schließlich werden die Osteoblasten-Fibrinogensuspension und die Endothelzell-Fibrinogensuspension miteinander durch Resuspension vermischt. Die Osteoblasten-Endothelzell-Fibrinogensuspension (OEFS) wird in ein poröses, dreidimensionales Trägermaterial, z.B. autoklavierte Spongiosa, eingesaugt. Pro ml OEFS werden 40 µl Calciumchlorid-Thrombinlösung zugesetzt (1,25 i.E. Thrombin pro ml, 40 mM Calciumchlorid). Das Konstrukt wird in eine Kulturschale oder eine Perfusionskammer eingebracht. Anschließend wird Endothelzellmedium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugegeben. Es erfolgt Kultivierung im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte für 1 bis 7 Tage bis zur Fusion mit der Knorpelkomponente.

Durch Zugabe der Calciumchlorid-Thrombinlösung bildet sich ein dreidimensionales Fibrinnetzwerk mit haftenden Osteoblasten und Endothelzellen in der Fibrinmatrix, welche das poröse Trägermaterial ausfüllt. Im Lichtmikroskop (100-fache Vergrößerung) zeigt sich die Ausbildung des osteoblastischen Phänotyps mit dendritischen Zellausläufern und der Aufbau von interzellulären Verbindungen der Osteoblasten. Dazwischen liegen kleinere Endothelzellen, die in vivo proliferieren und sich zu Kapillaren organisieren können.

Die Vitalität kann durch Trypanblaufärbung nach 7 Tagen untersucht werden. Dazu wird der Überstand des Kulturmediums abgesaugt, es werden 50 µl Trypanblaulösung zugegeben, anschließend wird das Präparat unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach 7 Tagen finden sich nur wenig abgestorbene Zellen.

Beispiel 6: Herstellung von Bandkomponenten

Fibroblasten werden als Suspension mit 1×10^7 bis 5×10^7 Zellen/ml Medium auf bandförmige Materialien geimpft und in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)-Medium mit 10% autologem Serum bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten.

Beispiel 7: Fusion der Einzelkomponenten

Primäre Chondrozytenkulturen wurden aus Rippenknorpelbiopsien etabliert und mit einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert. Anschließend wird durch eine Doppelspritze die Fibrinogenkomponente mit der chondroblastenhaltigen Thrombinkomponente zusammengebracht und in eine strukturierte, anatomisch angepaßte Form gegossen. Der Fibrinkleber verfestigt sich in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration innerhalb von 5-10 Minuten in der gewünschten Form. Parallel werden primäre Osteoblastenkulturen aus Beckenkamm-Biopsien (siehe Beispiel 2) hergestellt und der osteoblastische Phänotyp durch Alkalische Phosphatase und Osteocalcin nachgewiesen. Die Zellen werden auf dreidimensionalen, porösen Biomaterialien (z.B. bovine oder humane Spongiosa) als Suspension mit 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml viskösem Gel oder flüssigem Medium durch Vakuumaspiration aufgebracht. Die Adhäsion der Zellen wird durch Elektronenmikroskopie und die Proliferation durch XTT-Stoffwechseltests kontrolliert. Die einzelnen Konstrukte werden getrennt für drei Tage in vitro bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Im Anschluß erfolgt die Fusion der Knochen- und Knorpelkomponente durch Fibrinklebung.

Die Fusion kann auch abgewandelt wie folgt erreicht werden: Während des Prozesses der Herstellung der Knorpelkomponente und der Abbindung des Fibrinklebers wird das leere, vorgeformte und angepaßte Knochenträgermaterial leicht in die Knorpelschicht eingedrückt, so daß es fest eingebunden wird.

Im zweiten Schritt erfolgt dann die Besiedelung der Knochenkomponente durch die Osteoblastensuspension in einem viskösem Gel oder flüssigem Medium.

Als Ergebnis eines derartigen Versuchs waren Knorpel- und Knochenkomponente fest miteinander fusioniert. Die Knorpelfläche war glatt und war deutlich von der Knochenkomponente abgrenzbar. Makroskopisch bestand eine korrekte, stabile anatomische Gelenkform entsprechend den natürlichen anatomischen Gegebenheiten.

Knorpel-Knochenkonstrukte mit Bandapparat:

Die oben beschriebenen Knorpel-Knochenkonstrukte werden mit Bandkonstrukten verbunden, indem ein 0,5 mm großer Bohrkanal durch die Knochenkomponente gebohrt wird und das Bandkonstrukt, bestehend aus Fibroblasten auf einem Kollagenband, hindurchgezogen wird.

Das Bandkonstrukt ist fest integriert und kann zwei Knorpel-Knochenkonstrukte so verbinden und halten, daß die Knorpelflächen artikulieren und sich gegeneinander bewegen können.

Tierversuche:

Ca. sechs bis acht Wochen alte Nacktmäuse wurden in einer Narkosekammer mit einem Isofluran[®]-Sauerstoffgemisch (3% Isofluran[®] in 100% O₂, Fluß 4 l/min.) betäubt. Unter Aufrechterhaltung der Narkose mit einer Inhalationsmaske (1,5 - 2% (v/v) Isofluran[®] in 100 % O₂, Fluß 0,5 bis 1 l/min.) wurden die Tiere mit Betaisodona[®] abgewaschen und das Operationsgebiet steril abgedeckt. Es erfolgte ein ca. 2 cm langer, längs verlaufender Hautschnitt im Bereich des Rückens, Spreizen mit der Präparationsschere und Schaffen einer Hauttasche. Das osteochondrale Transplantat (ca. 2 x 0,5 x 0,5 cm) wurde eingelegt und die Wunde mit Einzelknopfnähten

verschlossen. Ein steriler Wundverband wurde angelegt. Der Eingriff dauerte etwa 15 Minuten. Die Wunden der Tiere wurden bis zur gesicherten Wundheilung täglich kontrolliert.

Die Nacktmäuse erhielten schließlich eine letale Dosis CO₂ per inhalationem am 21., 42. bzw. 63. Tag postoperativ. Die osteochondralen Konstrukte wurden mit dem umgebenden Gewebe herauspräpariert und danach histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Als Ergebnis waren in den fusionierten osteochondralen Konstrukten die Knorpel- und Knochenkomponente fest miteinander verbunden. Histologisch zeigte die Knorpelschicht die Morphologie von hyalinem Knorpelgewebe mit immunhistochemischem Nachweis von Kollagen Typ 2. In der Knochenkomponente fand sich nach acht Wochen ein appositionelles Knochenwachstum mit eingesproßten Kapillaren. Die Knorpelkomponente zeigte bei der biomechanischen Prüfung im "confined compression test" eine Steifigkeit (Kompressionsmodul) von 0,59 Mpa und eine hydraulische Permeabilität von $1,03 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$.

Beispiel 8: Lipofektion von Osteoblasten mit EGF-Plasmid

Humane Osteoblasten werden am Tag vor der Transfektion auf Gewebekulturbedälter verteilt. Dabei wurden Gewebekulturschalen mit 6 Vertiefungen (Fa. Costar, Kat. Nr. 3506, 9,6 cm² pro Vertiefung), im folgenden "6-well-Platten" genannt, und Zellkultureinsätze (Falcon Cell Culture Insert, Fa. Becton Dickinson, PET-Membran mit $1,6 \times 10^6$ Poren (1 µm) pro cm², Kat. Nr. 3102, 4,2 cm² Fläche) verwendet.

Es folgen zwei Protokolle, mit denen hohe Expressionen erreicht werden.

a) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in 6-well-Platten

Zur Herstellung der Transfektionslösung werden pro Ansatz 230 µl Medium 1 ohne Zusätze, 15 µl Escort[®]-Reagens (Fa. Sigma) und 6 µg Plasmid-DNA (enthaltend das Gen für humanes EGF) gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird der Lösung pro Ansatz 2 ml Medium 2 hinzugefügt. Das Kulturmedium wird von den Zellen entfernt und das Transfektionsgemisch wird zu den Zellen gegeben (2,25 ml/Vertiefung). Danach werden die Zellen 12 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Transfektionsgemisch wird von den Zellen entfernt, die dann mit Medium 2 gewaschen werden. Schließlich wird zur Weiterkultivierung ca. 3 ml Vollmedium in jede Vertiefung gegeben. Das Medium wird täglich gewechselt, von den Überständen werden Proben bei -20°C aufbewahrt, die dann zur Bestimmung des EGF-Gehalts verwendet werden. Die Epidermal growth factor (EGF)-Konzentration wurde durch einen ELISA bestimmt (QuantikineTM, R&D Systems, Kat. Nr. DEG-00). Hierzu müssen die Proben gegebenenfalls vorher 1:10-1:15 in Medium verdünnt werden, da der Meßbereich des ELISA 0-250 pg/ml beträgt.

Die Analyse ergab, daß EGF über 10 Tage mit einem Maximum am 5. Tag sezerniert wurde.

b) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in Zellkultureinsätzen ("Trennkammerversuch")

Bei den Zellkultureinsätzen handelt es sich um Einsätze, die eine poröse Membran aufweisen, an die die Zellen adhärieren können. Der Einsatz wird in eine Gewebekulturplatte mit (meist 6) Vertiefungen eingesetzt, so daß die "apikalen" Zellen in dem Einsatz ca. 3 mm von den "basalen" Zellen in der Vertiefung der Kulturschale räumlich getrennt sind, aber per diffusionem Signalstoffe über die permeable Membran austauschen können. Medium wird zur "basalen" und "apikalen" Seite der Zellen gegeben, also in die Vertiefung der

Zellkulturschale, in die der Einsatz eingesetzt ist und in den Einsatz selbst. Diese Anordnung kann benutzt werden, um einen parakrinen Effekt sezernierter Wachstumsfaktoren auf andere Zellen zu bestimmen. Dazu werden in den Zellkultureinsatz Osteoblasten ausgesät, die transfiziert werden. Nach der Transfektion werden die Einsätze in Platten transferiert, die mit nicht-transfizierten Zellen besät sind. Da das Medium und Faktoren, die von den transfizierten Zellen ausgeschieden werden, durch den Filter passieren können, kann durch Zellzahl-Bestimmung der nicht-transfizierten Zellen im anderen Kompartiment eine verstärkte Proliferation nachgewiesen werden.

Die Transfektionslösung wird wie in a) hergestellt. Das Kulturmedium wird aus der Vertiefung der Kulturplatte und aus dem Einsatz möglichst vollständig entfernt. In jeden Einsatz werden 2,25 ml Transfektionslösung gegeben. Nach 30-60 min Inkubation im Brutschrank wird 1 ml Vollmedium zugegeben. Falls während der Inkubationsphase die Transfektionslösung rasch durch den Filter des Einsatzes läuft, muß gegebenenfalls früher Medium zugegeben werden. Anschließend wird 12 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektionslösung wird abgesaugt, der Einsatz wird ausgiebig mit Medium gewaschen. Der Einsatz kann nun in eine Kulturschale mit Zellen überführt werden. Das Mediumvolumen beträgt insgesamt 4 ml/Vertiefung und Einsatz.

In einem Versuch wurden 10 mit Osteoblasten besäte Einsätze mit EGF-Plasmid transfiziert. Als Kontrollen wurden 10 Inserts mit Zellen nur mit Liposomenlösung ohne Plasmid behandelt, weitere 6 Einsätze wurden völlig unbehandelt gelassen, weitere 6 Einsätze wurden mit EGF-Plasmid transfiziert, nach der Transfektion wurde aber täglich 11,9 µg/ml Medium neutralisierender anti-EGF-Antikörper zugegeben (Fa. R&D, No. AB-236-NA, 1 mg/ml in PBS, pH 7,4, steril). Am Tag 6 nach der Transfektion wurde die Zellzahl der nicht-transfizierten Zellen im unteren Kompartiment durch Zellzählung mit einem "Casy TT"-Zellzähler bestimmt. Mit dem von der Firma Casy

hergestellten Gerät können Zellen in Lösungen spektrometrisch gezählt werden. Das Ergebnis ist in Figur 2 gezeigt. Beide Kontrollansätze ("Liposom" und "unbehandelt") zeigen signifikant niedrigere Zellzahlen als der Ansatz, in dem EGF-Plasmid transfiziert wurde ("EGF/Liposom"). Das zeigt, daß die transfizierten Zellen einen proliferativen Effekt haben. Die dritte Kontrolle ("Antikörper") zeigt wiederum niedrigere Zellzahlen als der Ansatz mit transfizierten Zellen, aber ohne Antikörper ("EGF/Liposom"). Das beweist, daß der proliferative Effekt auf EGF zurückzuführen ist. Dieses Experiment zeigt, daß durch transiente Lipofektion von Osteoblasten Zellen erzeugt werden können, die Wachstumsfaktoren sezernieren, die das Wachstum anderer Zellen stimulieren können.

In einem weiteren "Trennkammerversuch" wurde der proliferative Effekt EGF-transfizierter Osteoblasten mit dem proliferativen Effekt von rekombinantem, humanem EGF verglichen, das den Zellen täglich zugesetzt wurde. Am Tag 4 nach Transfektion wurde die Zellzahl der verschiedenen Ansätze bestimmt. Das geschah durch automatische Zellzählung mittels "Casy TT" und durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer. Das Ergebnis ist in Figur 3 gezeigt. Nach Transfektion mit EGF-DNA ("EGF-Transfektion") ist die Zellzahl des Transfektionsansatzes fast doppelt so hoch wie die des nicht transfizierten Kontrollansatzes ("Kontrolle"). Zugegebenes rekombinantes EGF (1 ng/ml jeden Tag) bewirkt zwar auch verstärktes Wachstum ("rhEGF-Zugabe"), jedoch nicht so stark wie es durch die Transfektion erreicht wird.

Beispiel 9: Lipofektion von Osteoblasten mit hbFGF-Plasmid

Osteoblasten werden mit einem Plasmid transfiziert, das eine Nucleinsäure enthält, die für humanen "basic fibroblast growth factor" (hbFGF) codiert.

Am Vortag der Transfektion werden die Zellen auf betreffende Kulturbedälter verteilt (z.B. 6-well-Platten oder

Zellkultureinsätze für den Trennkammerversuch). Eingesetzt werden je 40000 Zellen pro Vertiefung der 6-well-Platte (9,6 cm² Wachstumsfläche pro Vertiefung) oder pro Zellkultureinsatz (4,2 cm² Wachstumsfläche pro Einsatz). Es folgen zwei Protokolle, mit denen eine hohe Expression der transfizierten Gene erzielt wurde.

- a) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in 6-well-Platten (EscortTM-Reagens, Fa. Sigma)

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von 115 µl Medium 1, 9 µl EscortTM-Reagens (Fa. Sigma) und 3 µg hbFGF-Plasmid pro Ansatz hergestellt. Alternativ können auch 115 µl Medium 1, 15 µl EscortTM-Reagens und 5 µg Plasmid gemischt werden. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird das Kulturmedium von den Zellen entfernt, statt dessen wird 1 ml Medium mit Zusätzen zu den Zellen gegeben, gefolgt von der Transfektionslösung. Anschließend wird 1-2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es folgt Zugabe von 2 ml Medium/Vertiefung und 24 h Inkubation bei 7°C und 5% CO₂. Weiterhin wird das Medium täglich gewechselt, wobei Proben des Kulturüberstandes bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt werden. Die bFGF-Konzentration in den Proben wird durch ELISA bestimmt. Das Ergebnis ist in Figur 4 gezeigt. Bei Verwendung von 3 µg DNA und 9 µl EscortTM ist die FGF-Sekretion am Tag 3 nach der Transfektion am höchsten, bei Verwendung von 5 µg DNA und 15 µl EscortTM am Tag 5 nach der Transfektion. Die ins Medium abgegebene FGF-Menge ist bei Transfektion mit 5 µg DNA höher.

- b) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in 6-well-Platten (Fugene[®]-Reagens)

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von Medium ohne Zusätze, Fugene[®]-Reagens (Fa. Roche Diagnostics) und DNA hergestellt. Es wurden 3 Varianten getestet:

Ansatz:	A	B	C
μ l Medium ohne Zusätze:	97	94	91
μ l Fugene [®] -Reagens:	3	6	9
μ g hbFGF-Plasmid:	3	3	3

Dabei werden jeweils das Medium und das Fugene[®]-Reagens zuerst gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die DNA zugegeben, nach Mischen wird weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wird von den Zellen entfernt, dann werden pro Vertiefung 3 ml Medium und danach die Transfektionslösung zugegeben. Es folgt eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Im Folgenden wird täglich das Medium gewechselt, wobei wiederum Proben des Kulturüberstandes bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Die FGF-Konzentration im Medium wird durch ELISA bestimmt. Auch bei Verwendung des Fugene-Reagens' kann die DNA-Menge variiert werden. Es wurden 3 und 5 μ g Plasmid getestet. Das Ergebnis ist in Figur 5 gezeigt. Am Tag 7 nach der Transfektion wird bei Einsatz von 3 μ g DNA mehr FGF sezerniert als bei Einsatz von 5 μ g DNA ("3 μ g Plasmid/Fugene[®]" und "5 μ g Plasmid/Fugene[®]"). Als Kontrolle wurde auch nur DNA ohne Fugene[®]-Reagens "transfiziert". Die gemessene FGF-Menge ist deutlich niedriger als bei Verwendung von Fugene[®] ("3 μ g Plasmid" und "5 μ g Plasmid"). Als weitere Kontrolle wurde die Fibroblast-Growth-Factor (FGF)-Konzentration im Medium von völlig unbehandelten Zellen ermittelt ("unbeh. Zellen").

Das Ergebnis zeigt, daß Osteoblasten erfolgreich mit hbFGF-DNA transfiziert werden können und daß daraufhin mehr FGF ans Medium abgegeben wird.

c) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in Zellkultureinsätzen ("Trennkammerversuch")

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von 115 µl Medium ohne Zusätze, 15 µl Escort[®]-Reagens und 5 µg hbFGF-Plasmid hergestellt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wird 2 ml Medium 2 zugegeben. Das Kulturmedium wird aus dem Zellkultureinsatz, in dem die zu transfizierenden Zellen sind, und aus der Vertiefung der 6-well-Platte, in der sich der Einsatz befindet, möglichst vollständig entfernt. Pro Einsatz werden 2,25 ml Transfektionslösung zu den Zellen gegeben. Es wird 30-60 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird 1 ml Vollmedium pro Einsatz zugegeben (gegebenenfalls muß früher Medium zugegeben werden, falls die Transfektionslösung schnell durch den Filter des Einsatzes läuft). Es wird nochmals 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Transfektionslösung abgesaugt, der Einsatz wird ausgiebig mit Medium gewaschen. Der Einsatz wird nun in eine Kulturschale mit nicht-transfizierten Zellen eingesetzt, deren Proliferation überwacht wird. Das Medium-Volumen von Einsatz und Kulturschale zusammen beträgt 4 ml.

An Tag 4 nach der Transfektion wurde in einem solchen Versuch die Zellzahl der nicht-transfizierten Zellen in den unteren Kompartimenten bestimmt. Figur 6 zeigt das Ergebnis. Die Kontrolle zeigt die natürliche Vermehrung von Zellen in 4 Tagen ("unbeh. Zellen"). Sowohl die Anwesenheit hbFGF-transfizierter Zellen ("5 µg Plasmid/15 µl EscortTM") als auch Zugabe von rekombinantem humanem bFGF ("rek. bFGF 4 ng/ml") führen im Vergleich mit der Kontrolle zu erhöhter Proliferation der Zellen. Das zeigt, daß die transfizierten Zellen durch FGF-Sekretion parakrin das Wachstum nicht-transfizierter Zellen stimulieren können.

Beispiel 10: Lipofektion von Osteoblasten mit hVEGF-Plasmid

Subkonfluente Osteoblasten werden mit DNA transfiziert, die für humanen "vascular endothelial growth factor" (hVEGF) codiert. Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen auf betreffende Kulturbedälter verteilt. Bei Verwendung von 6-well-Platten werden 50000 Zellen pro Vertiefung eingesetzt.

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von Medium ohne Zusätze, Fugene®-Reagens (Fa. Roche Diagnostics) und DNA hergestellt. Es wurden 4 Varianten getestet:

Ansatz:	A	B	C	D
µl Medium ohne Zusätze:	94	91	90	85
µl Fugene-Reagens:	6	9	10	15
µg hVEGF-Plasmid:	3	3	5	5

Dabei werden jeweils das Medium und das Fugene-Reagens zuerst gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die DNA zugegeben, nach Mischen wird weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wird von den Zellen entfernt, dann werden pro Vertiefung 3 ml Medium und danach die Transfektionslösung zugegeben. Es folgt eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Im Folgenden wird täglich das Medium gewechselt, wobei wiederum Proben des Kulturüberstandes bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Die VEGF-Konzentration im Medium wird durch ELISA bestimmt. Das Ergebnis der oben genannten Ansätze ist in Figur 7 gezeigt. Am Tag 7 nach der Transfektion wurde die VEGF-Konzentration bestimmt. Die 4 Ansätze ("A" bis "D") zeigen gegenüber der Kontrolle, die die VEGF-Konzentration im Medium von unbehandelten Zellen zeigt ("unbeh. Zellen"), erhöhte VEGF-Werte. Die Werte sind auch höher als bei Ansätzen, in

denen die Zellen nur mit Plasmid, aber ohne Fugene-Reagens behandelt wurden ("5 µg Plasmid").

Der induktive Effekt transfizierter Osteoblasten (Ansatz B der Tabelle in Beispiel 10) auf das Wachstum von mikrovaskulären Endothelzellen wurde in der Trennkammer untersucht (Verfahren siehe Beispiel 8b)). Das Ergebnis ist in Figur 8 dargestellt. Es zeigte sich ein deutlich beschleunigtes Wachstum der Endothelzellen gegenüber der Kontrolle ohne transfizierte Osteoblasten.

Beispiel 11: Elektroporation von Osteoblasten mit EGF-Plasmid

Osteoblasten in Kultur werden durch Trypsinierung abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Die Zellsuspension wird auf $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Je 300 µl dieser Suspension werden in eine Elektroporationsküvette (Gene Pulser®/E.coli Pulser™ Cuvette, Cat. No. 165-2086, 0,2 cm gap electrode, Fa. BioRad, CA 94547) überführt. Die gap electrode ist eine Elektrode, mit der bei der Elektroporation elektrische Felder im Nähermedium erzeugt werden. 30 µg DNA (hEGF-Plasmid) werden zu den Zellen in die Küvette gegeben. Eine parallel vorbereitete Kontrollküvette mit Zellen erhält keine DNA. Anschließend werden die Küvetten 10 min auf Eis inkubiert.

Die eigentliche Elektroporation wird mit einem Gerät zur Durchführung von Elektroporationen "Gene Pulser II System" der Fa. BioRad durchgeführt (Cat. No. der main unit: 165-2105). Die Einstellungen sind 150 oder 250 V und 960 µF; die Elektroporationszeit wird von dem Gerät automatisch bestimmt, sie beträgt etwa 4 Sekunden. Die Küvette wird in die Halterung der "shocking chamber" (Kammer, in der Zellen in Näherlösung eingebracht werden und in der elektrische Felder erzeugt werden können) eingespannt, wo die Elektroporation stattfindet. Nach der Elektroporation wird die Küvette aus der Halterung entnommen und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden in Medium (Osteoblastenmedium, z.B. BGJ-B-Medium, Fa.

Gibco, mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% (v/v) Serum; bei therapeutischem Einsatz wird autologes, humanes Serum verwendet, bei Experimenten fötales Kälberserum) resuspendiert und auf Gewebekulturschalen verteilt. Das Medium wird täglich gewechselt (Nachweis von EGF "nicht-kumulativ"). Alternativ kann das Medium nicht gewechselt werden (Nachweis von EGF "kumulativ"). In einem "nicht-kumulativen" Experiment wurden von den 4 ml Kulturüberstand täglich Proben entnommen, die bei -20°C aufbewahrt wurden, bis durch ELISA die EGF-Konzentration bestimmt wurde. Es wurden aber $1,25 \cdot 10^6$ humane Osteoblasten elektroporiert (250 V, 960 µF; 3,9 s, 20 µg DNA). Das Ergebnis ist in Figur 9 dargestellt. Die gemessene EGF-Konzentration ist in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen aufgetragen. Die EGF-Sekretion ins Medium hat am Tag 2 nach Transfektion ein Maximum. EGF-Expression ist mehr als eine Woche lang nachweisbar.

Universitätsklinikum Freiburg

Patentansprüche:

1. Biologisches, zumindest teilweise in vitro hergestelltes Gelenkkonstrukt, das wenigstens folgende Bestandteile umfaßt:

- a) wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial;
- b) Knorpelgewebe enthaltend Chondrocyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz;
- c) Knochengewebe enthaltend Osteoblasten und/oder Osteocyten und Knochensubstanz;

wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind.

2. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe zur Verbesserung der Angiogenese ein Wachstumsfaktorprotein, Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen, oder mit einem Wachstumsfaktorgen transfizierte Zellen enthält.

3. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Gelenkseite aufweist, die Kontakt zu einem anderen Gelenkteil haben kann und deren Oberfläche aus Knorpelgewebe besteht, und eine Ankerseite, die zur Verankerung des Gelenkkonstrukts im Knochenschaft dienen kann und die aus Knochengewebe besteht.

4. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankerseite wenigstens einen zylinderförmigen Zapfen aufweist, der mit einem Knochenschaft verbunden werden kann.

5. Biologisches Gelenkkonstrukt nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich wenigstens eine Bandkomponente umfaßt, die zwei Gelenkteile funktionell miteinander verbinden kann.

6. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gelenkkonstrukt zum Teilersatz einer Gelenkfläche geeignet ist und als einzelnes präformiertes Konstrukt ausgebildet ist.

7. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gelenkkonstrukt zum Teilersatz einer Gelenkfläche geeignet ist und als osteochondraler Zylinder ausgebildet ist.

8. Biologischer Gelenkersatz, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Gelenkkonstrukte nach einem der Ansprüche 3-5 mit ihren Gelenkseiten Kontakt zueinander haben und mit ihren Ankerseiten in 2 verschiedenen Knochenschäften verankert werden können.

9. Biologischer Gelenkersatz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Gelenkkonstrukte durch wenigstens 2 Bandkomponenten verbunden sind.

10. Biologischer Gelenkersatz nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Gelenkkapsel aufweist.

11. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstruktes, das folgende Schritte umfaßt:

a) Bereitstellung einer Knochenkomponente durch Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit Osteoblasten;

b) Bereitstellung einer Knorpelkomponente durch Herstellung einer Suspension von Chondrocyten in einem

Medium oder Gel oder durch Besiedelung einer bioverträglichen Trägersubstanz mit Chondrocyten;

c) Verbindung der Knochen- und der Knorpelkomponente, so daß das Trägermaterial in den Knorpel integriert wird;

d) Züchtung des Konstruktes in vitro, wobei durch Stimulation der Zellen zur Anheftung und zur Synthese ihrer gewebespezifischen extrazellulären Matrix eine biologische Vernetzung der zusammengesetzten Komponenten erreicht wird;

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial der Knochenkomponente (a) so geformt wird, daß es eine Gelenkseite zur Aufnahme einer Knorpelfläche und eine Ankerseite zur Verbindung mit einem Knochen aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bereitstellung der Knorpelkomponente (b)

aa) Chondrocyten in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert werden,

bb) diese Suspension mit der Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers gemischt wird,

cc) die Mischung in eine anatomisch gewünschte Form gebracht wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die Knochen- (a) und die Knorpelkomponente (b) vor der Verbindung getrennt in vitro kultiviert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung (c) von Knochen- und Knorpelkomponente mittels Fibrinklebung erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß während der Verfestigung des Fibrinklebers bei der Herstellung der Knorpelkomponente das noch nicht durch Osteoblasten besiedelte Trägermaterial der Knochenkomponente in die Knorpelschicht gedrückt wird, so daß es fest eingebunden wird und, daß später die Besiedelung der Knochenkomponente durch Osteoblasten erfolgt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-16, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin die Herstellung einer Bandkomponente aus faserartigen Materialien und Fibroblasten umfaßt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-17, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin die Herstellung einer Kapselkomponente aus faserartigen, membranösen Materialien und Fibroblasten umfaßt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-18, dadurch gekennzeichnet, daß an dem Trägermaterial der Knochenkomponente nach der Formgebung wenigstens eine Bandverbindungsstelle zur Anbringung von Gelenkbändern angebracht wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-19, dadurch gekennzeichnet, daß an dem Trägermaterial der Knochenkomponente wenigstens ein Kapselverbindungsareal zur Anbringung einer Gelenkkapsel angebracht wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-20, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Bandkomponente an einer Bandverbindungsstelle der Knochenkomponente gemäß Anspruch 19 angebracht wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-21, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Kapselkomponente an einem

Kapselverbindungsareal der Knochenkomponente gemäß Anspruch 20 angebracht wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-22, dadurch gekennzeichnet, daß der Knochenkomponente Endothelzellen, ein Wachstumsfaktorprotein, oder mit einem Wachstumsfaktorgen transfizierte Zellen hinzugefügt werden.

24. Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe, dadurch gekennzeichnet, daß Spongiosa als Trägermaterial verwendet wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß autoklavierte, humane, allogene Spongiosa als Trägermaterial verwendet wird.

26. Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Isolierung von Knochenzellen oder Knochenvorläuferzellen;
- b) Transfektion der Zellen durch nicht-viralen Gentransfer mit wenigstens einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor codiert;
- c) Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit den transfizierten Zellen;
- d) Züchtung der Zell-Trägermaterial-Konstrukte in vitro.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Zellen vor der Transfektion vermehrt werden.

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Lipofektion erfolgt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26-28, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion transient ist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26-29, dadurch gekennzeichnet, daß das transfizierte Gen oder wenigstens eines der transfizierten Gene für einen Wachstumsfaktor codiert, der aus folgender Gruppe ausgewählt ist: EGF, bFGF, VEGF, BMP-1 bis BMP-20, TGF- β , PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, Ang I, Ang II.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 26-30, dadurch gekennzeichnet, daß das bioverträgliche Trägermaterial auch mit nicht transfizierten Zellen besiedelt wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 26-31, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Zellen stromale Zellen sind.

33. Knochengewebe, enthaltend folgende Bestandteile:

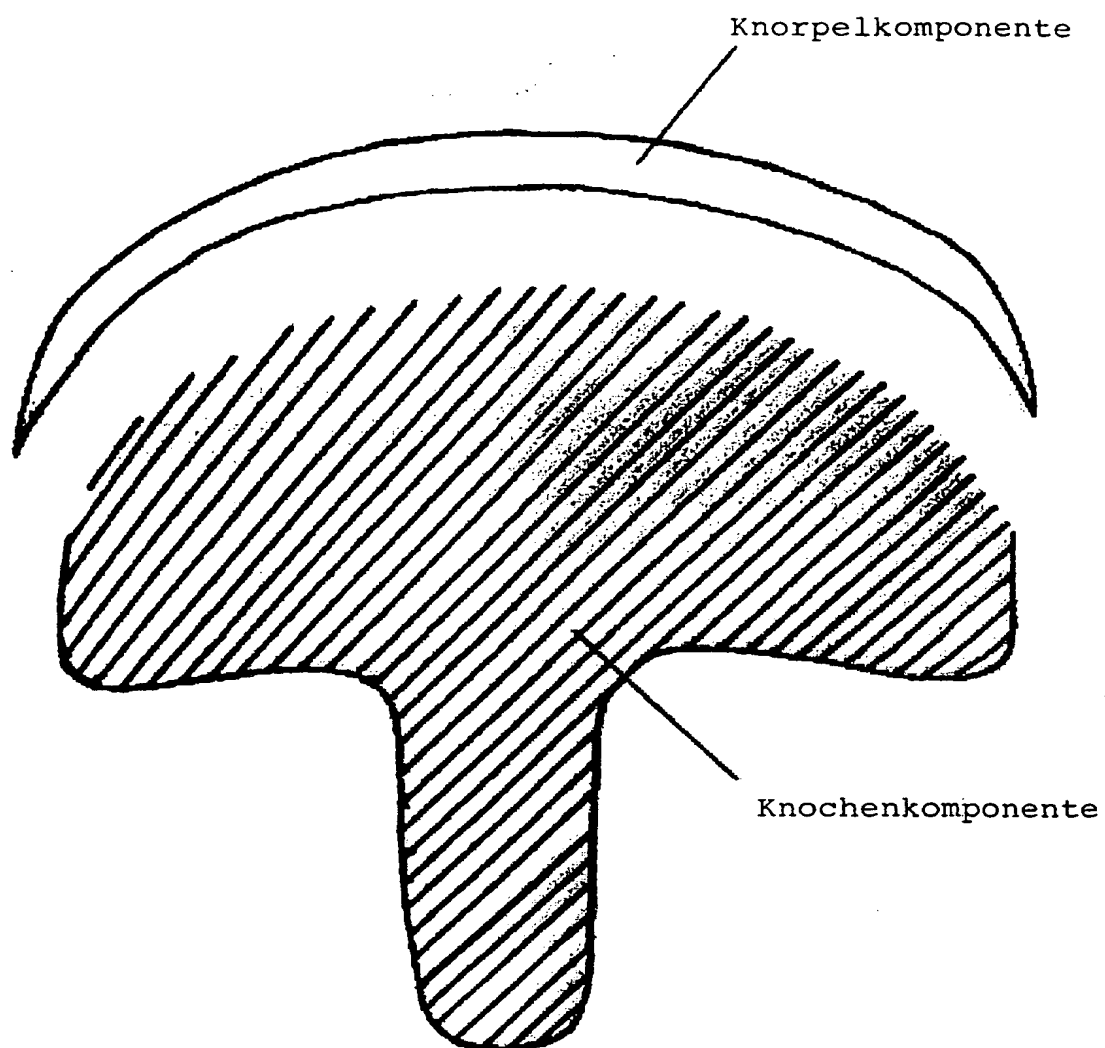
a) Osteoblasten, die in vitro durch nicht-viralen Gentransfer mit einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor codiert, transfiziert worden sind;

b) wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial

34. Knochengewebe nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß es nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24-32 erhalten werden kann.

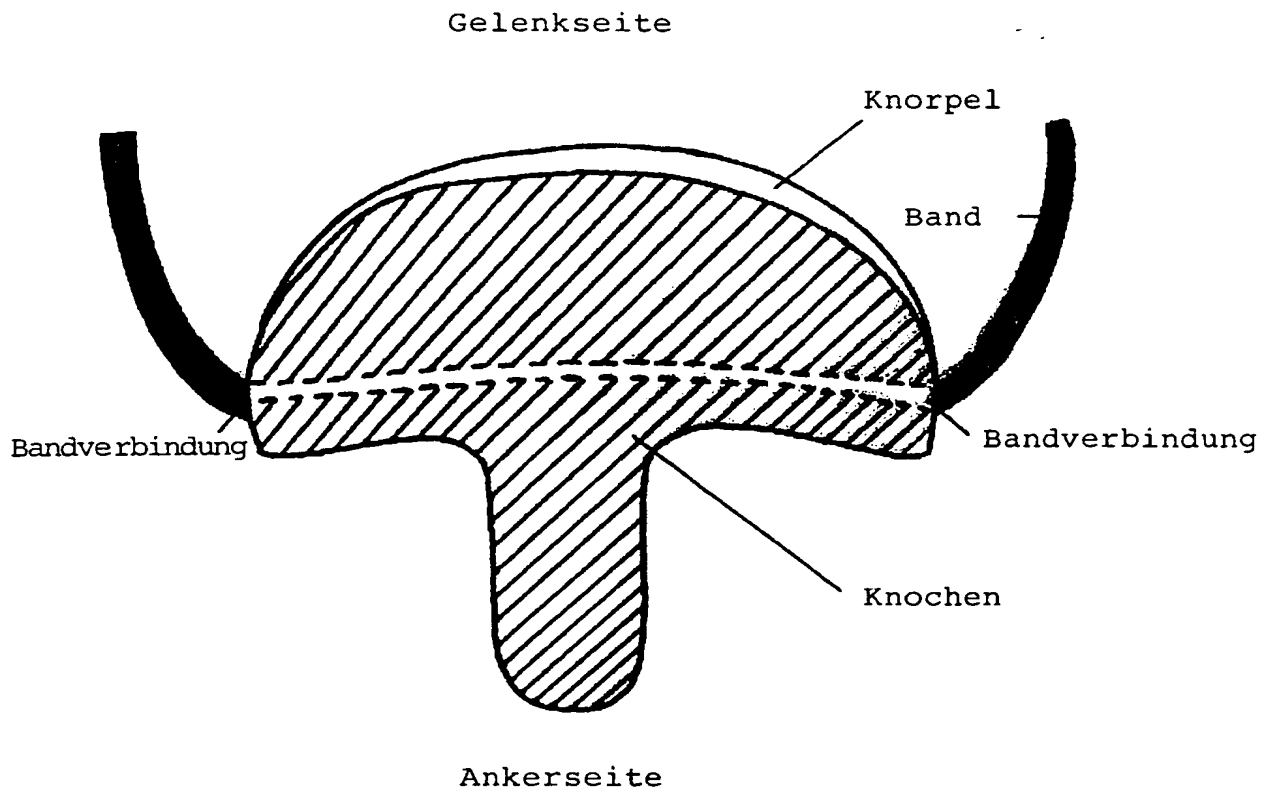
35. Verwendung von Knochengewebe gemäß Anspruch 34 bei einem Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstrukts gemäß einem der Ansprüche 11 bis 23.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



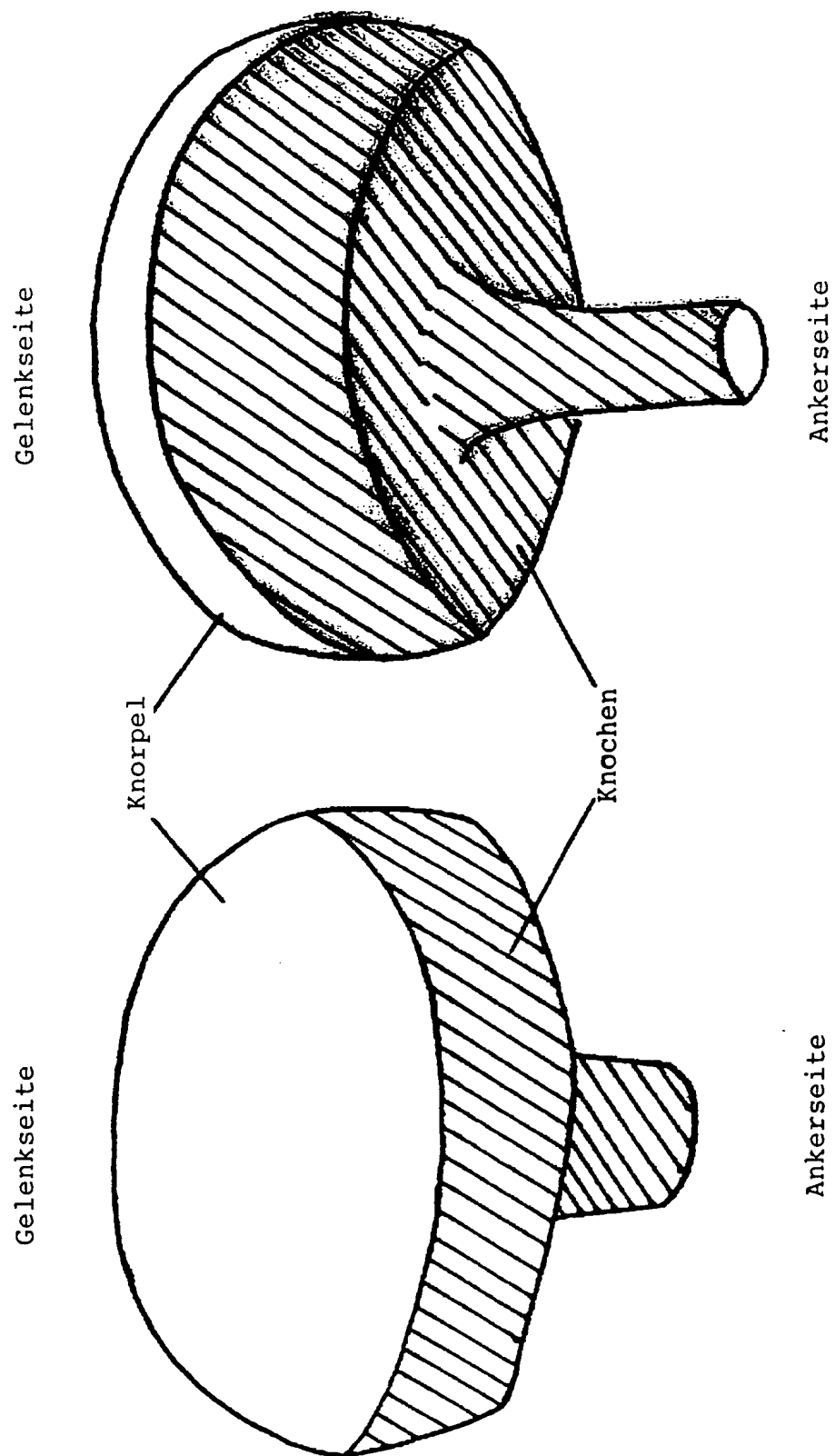
Figur 1a)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



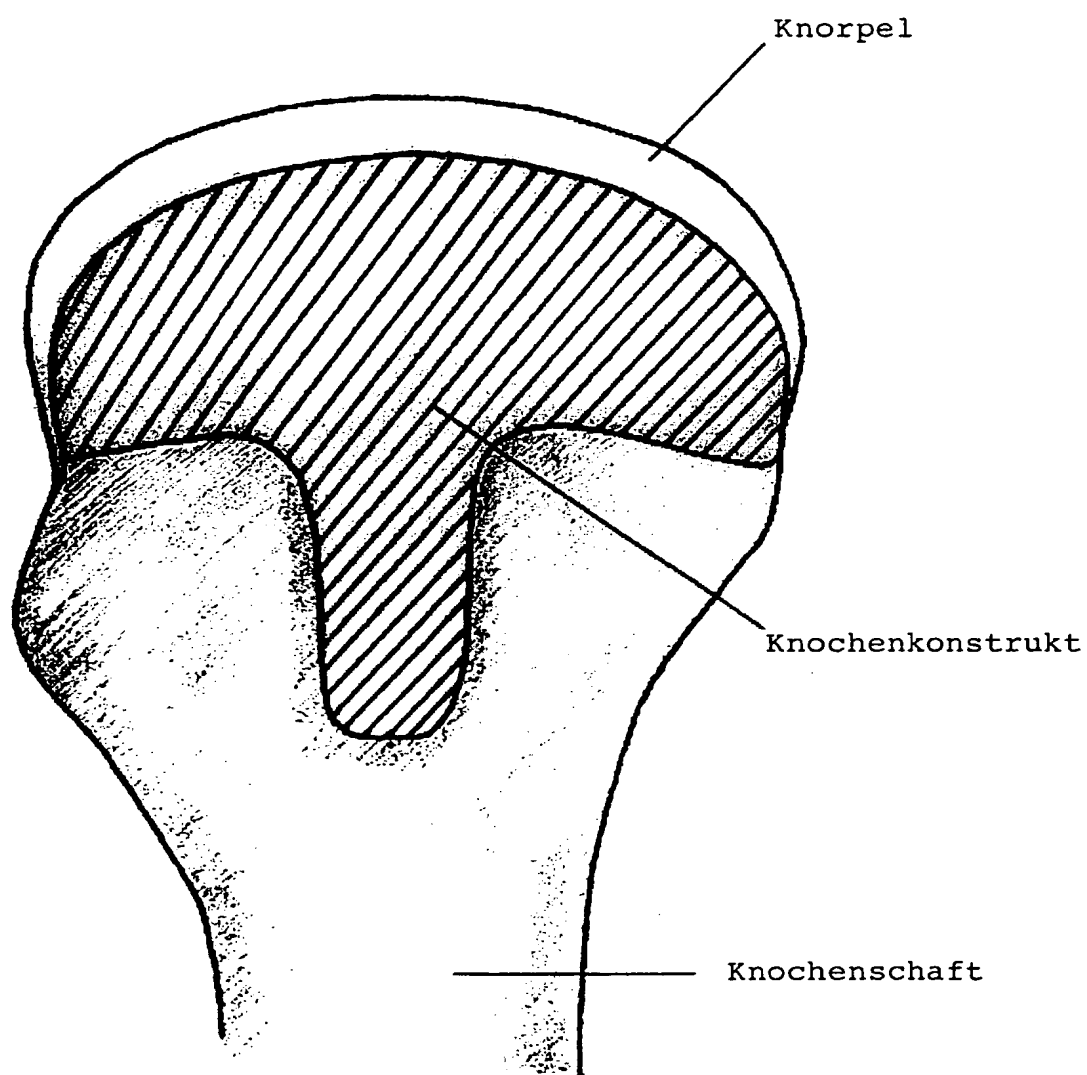
Figur 1b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



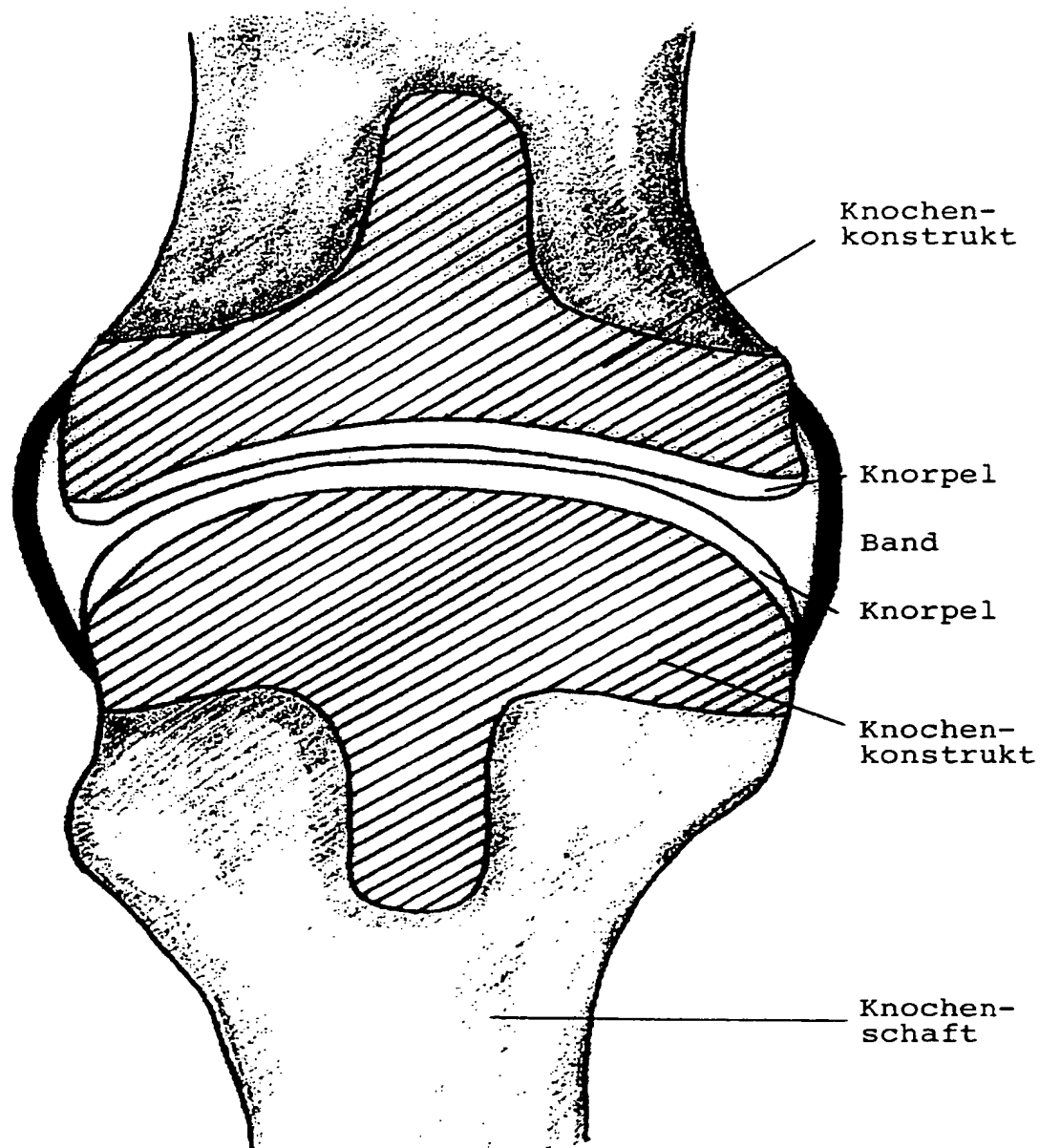
Figur 1c)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



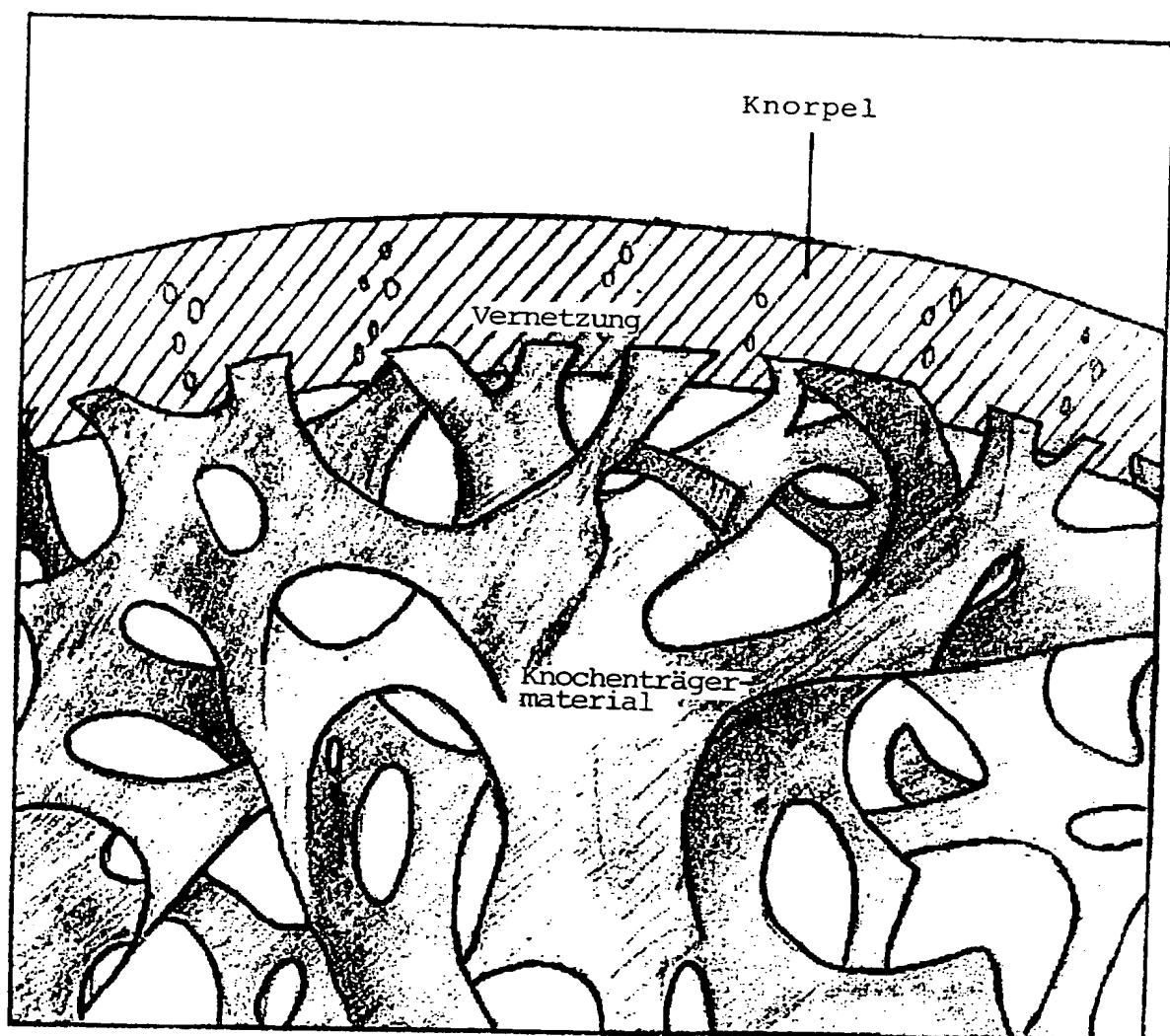
Figur 1d)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



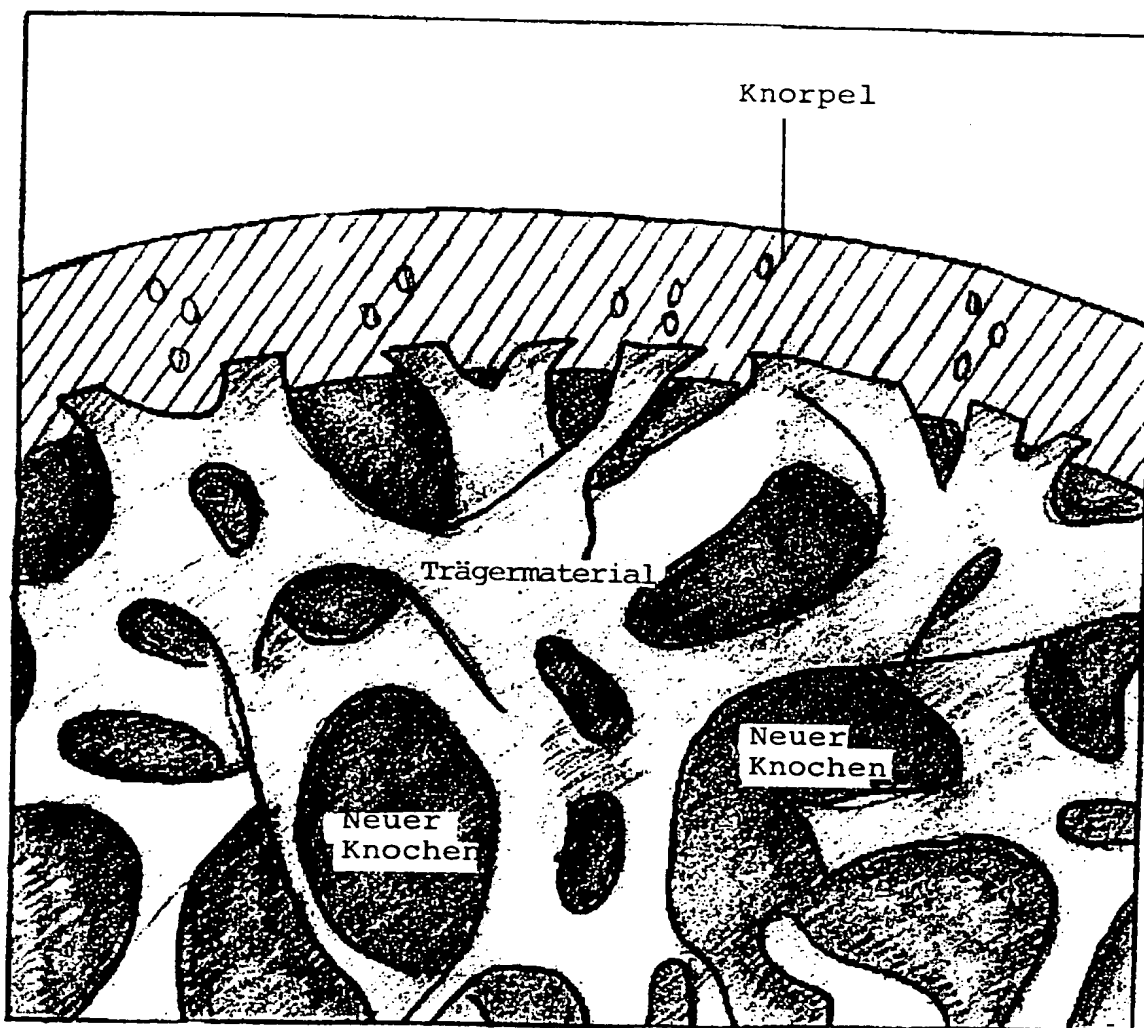
Figur 1e)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



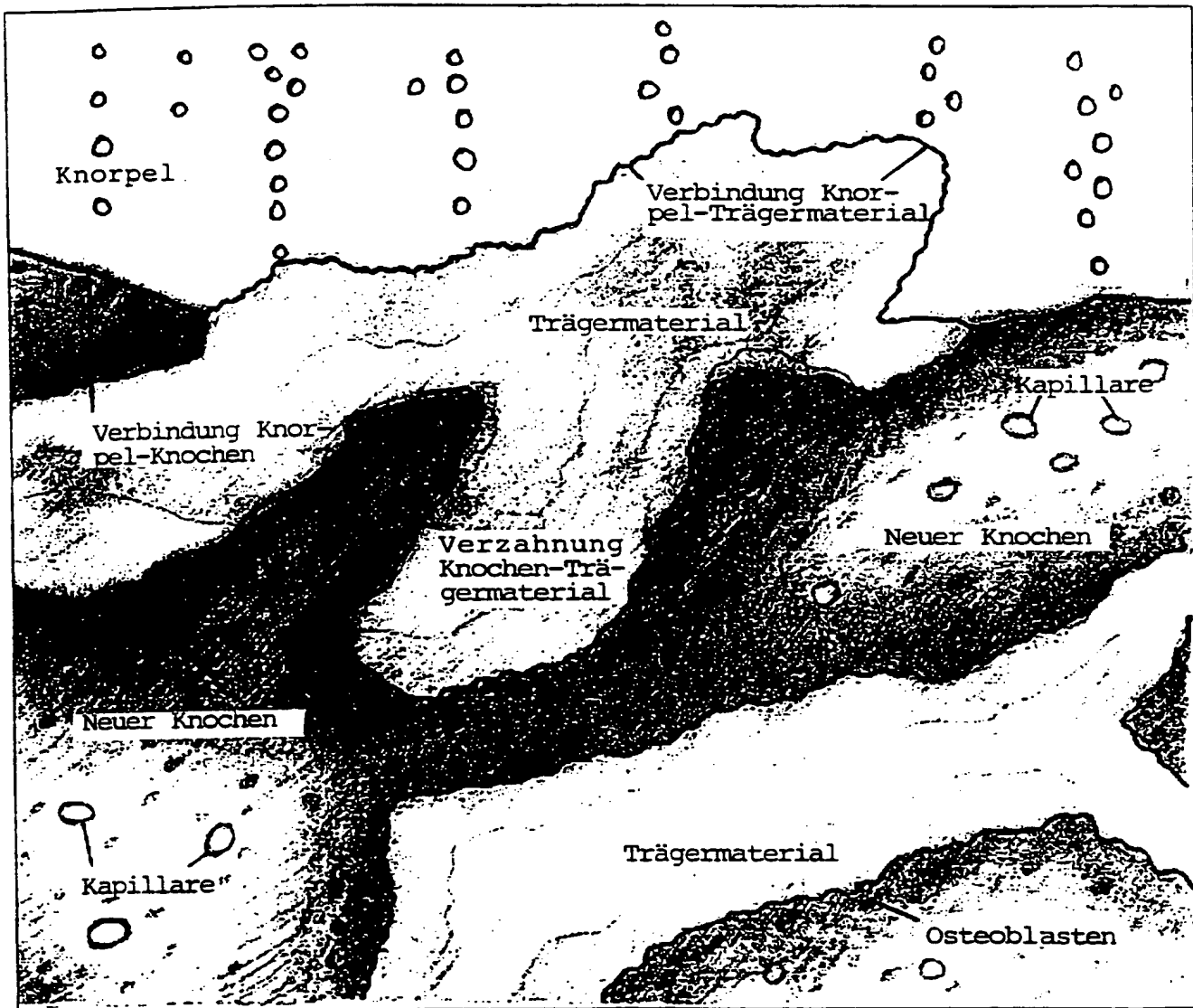
Figur 1f)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figur 1g)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

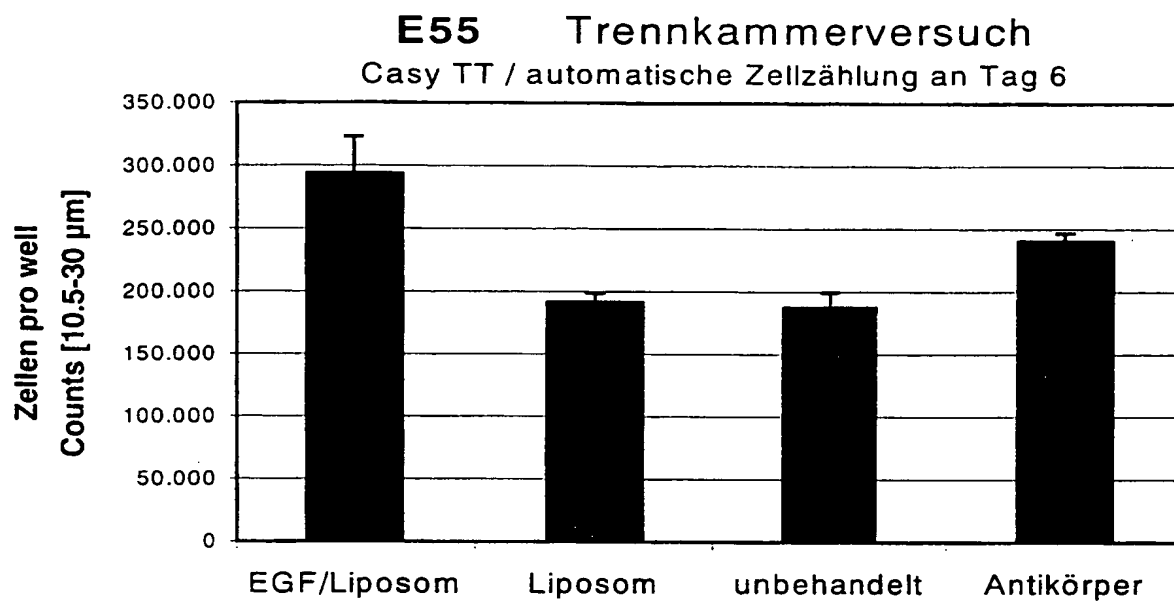


Figur 1h)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/16

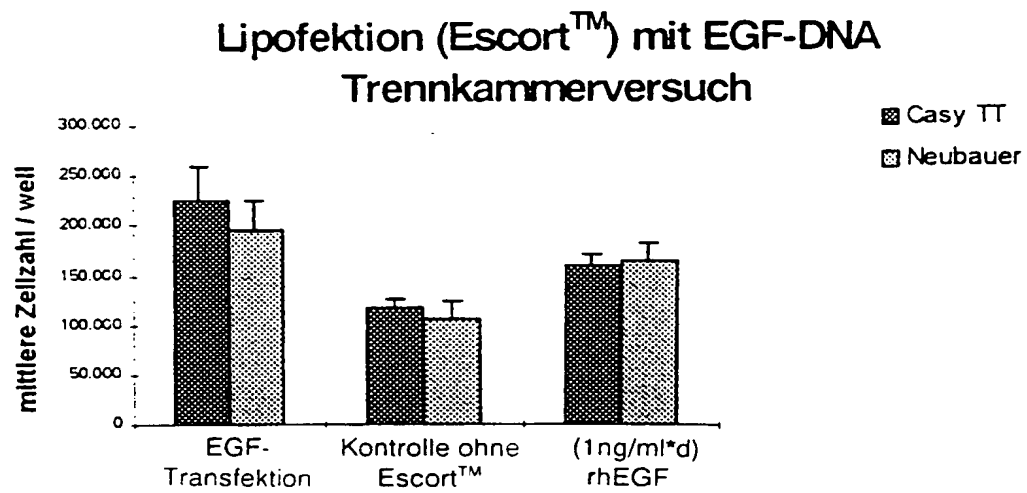
Figur 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 3

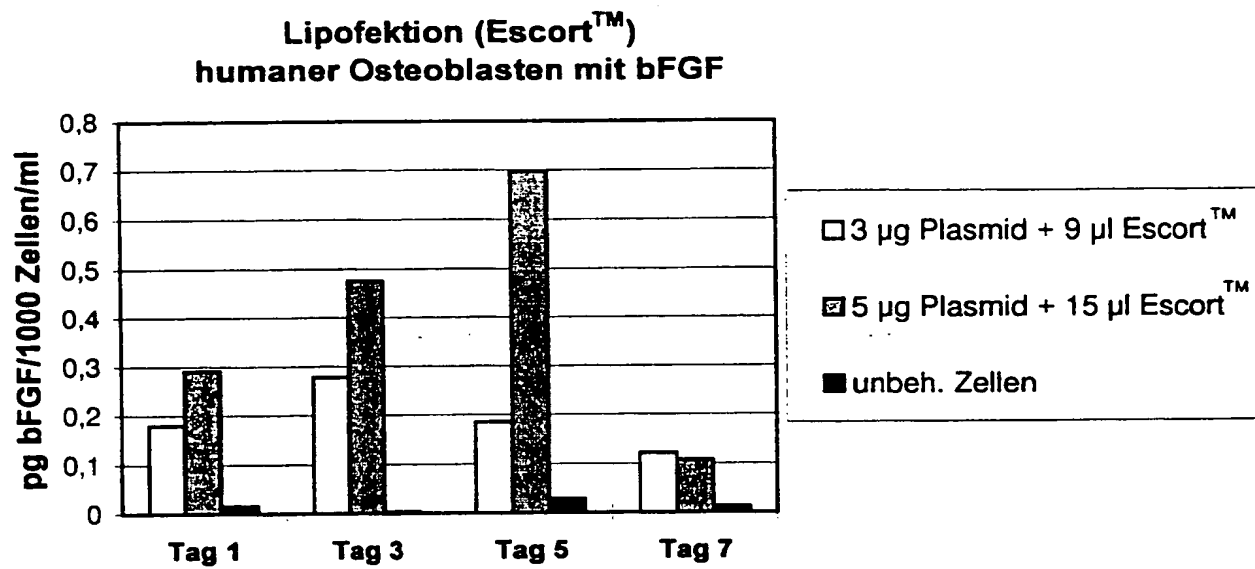
10/16



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/16

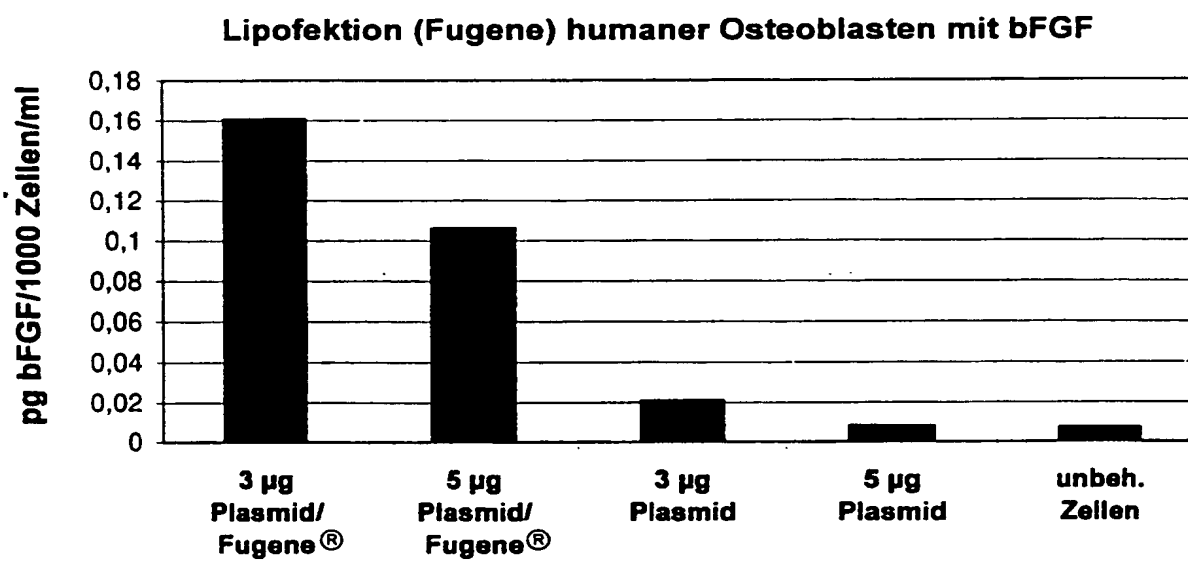
Figur 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

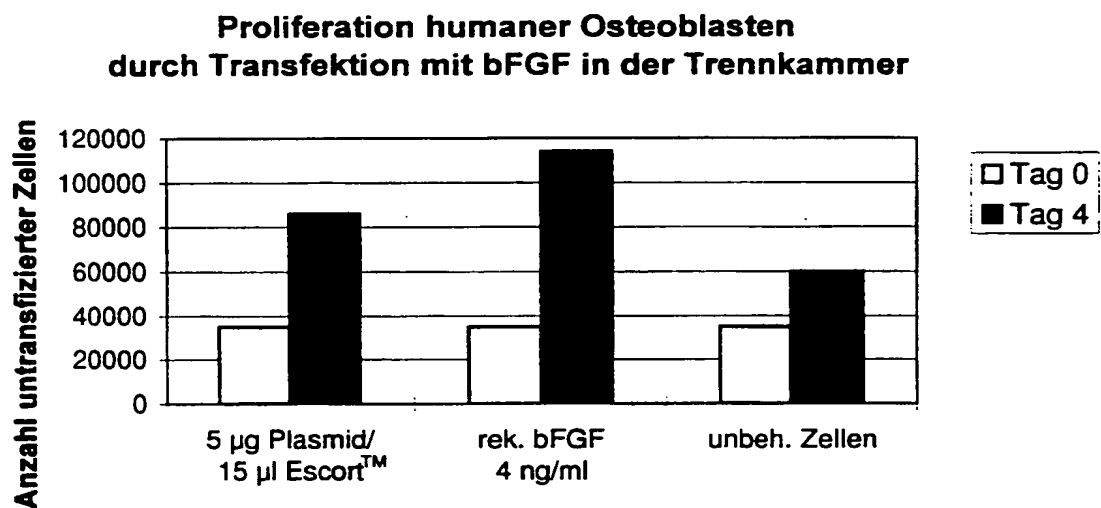
12/16

Figur 5



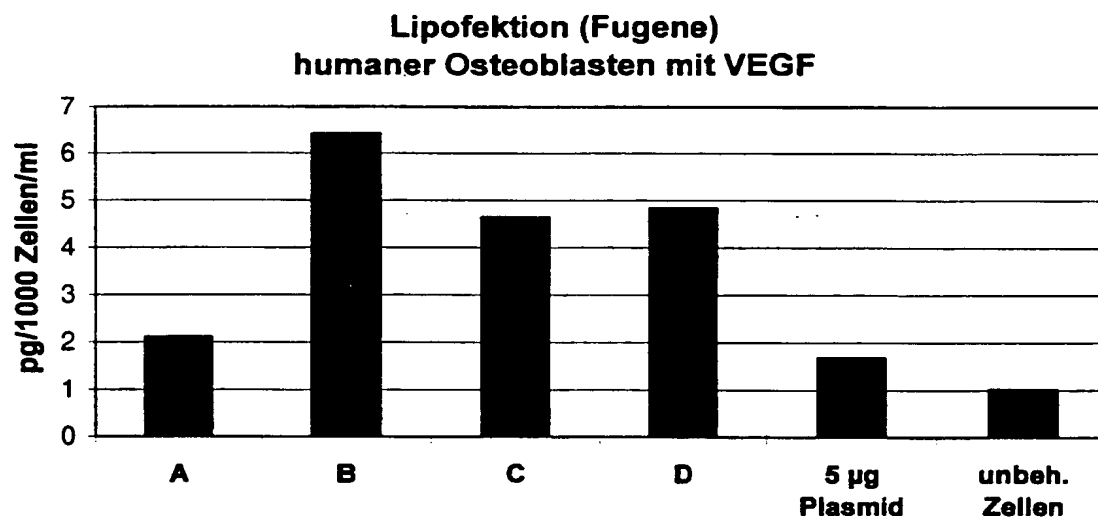
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 6



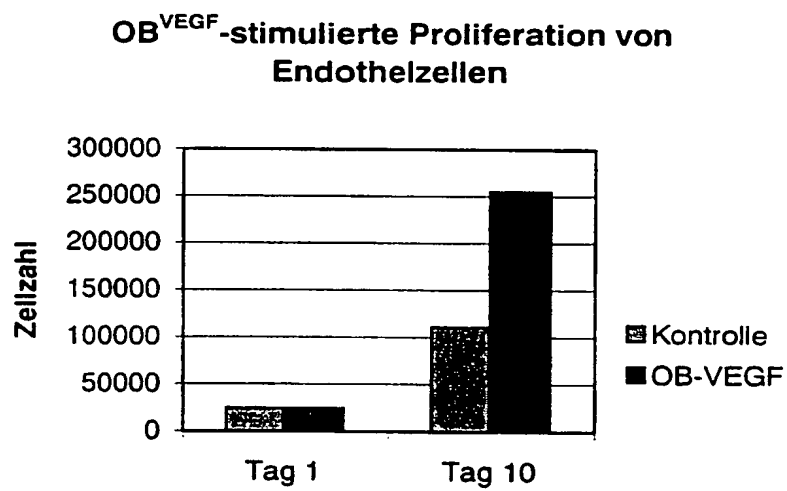
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 7



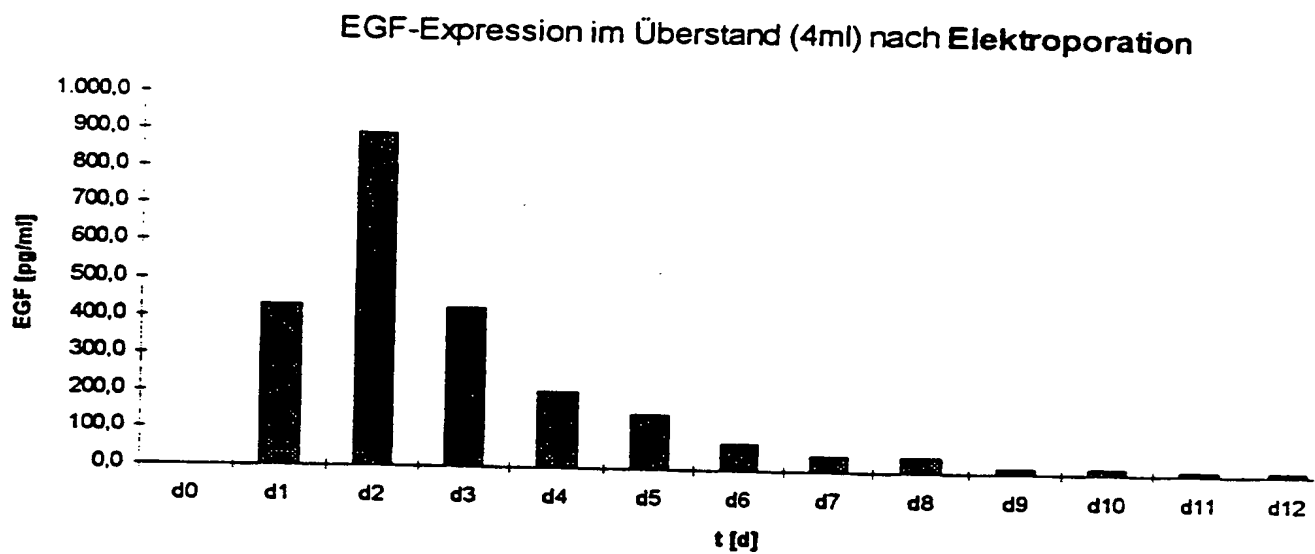
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



10/009527

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/074741 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61L 27/26,
27/40, A61F 2/08, 2/30, A61L 27/38, C12N 5/10, 15/88

(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzre-
gentenstr. 16, D-80538 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05313

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juni 2000 (08.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 26 083.4 8. Juni 1999 (08.06.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG [DE/DE]; Hugstetter Str. 49, D-79106 Freiburg (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHAEFER, Dirk, Johannes [DE/DE]; Maltererstr. 8, D-79102 Freiburg (DE). KLEMT, Christof [DE/DE]; Krafftgasse 1, D-79379 Mullheim (DE). STARK, Gerhard, Björn [DE/DE]; Am Rossberg 25, D-79874 Breimau (DE). FRIEDL, Hans-Peter [DE/DE]; Hohenzollernweg 7, D-79224 Umkirch (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 18. Juli 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BIOLOGICAL JOINT CONSTRUCT

(54) Bezeichnung: BIOLOGISCHES GELENKKONSTRUKT

(57) Abstract: The invention relates to a biological joint construct which is at least partially produced in an in vitro manner and which comprises at least one biocompatible supporting material, cartilaginous tissue and osseous tissue, whereby the cartilaginous tissue and osseous tissue are joined to one another in a fixed manner. The invention also relates to a method for producing this joint construct. An additional aspect of the invention is osseous tissue that contains the transfected cells and a method for producing the same. Another aspect of the invention is osseous tissue that contains angiopoietic cells or angiogenic growth factors as well as a method for the production thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein biologisches, zumindest teilweise in vitro hergestelltes Gelenkkonstrukt, das wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial, Knorpelgewebe und Knochengewebe umfasst, wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind. Die Erfindung betrifft ausserdem ein Verfahren zur Herstellung dieses Gelenkkonstrukts. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist Knochengewebe, das transfizierte Zellen enthält, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist Knochengewebe, das gefässbildende Zellen oder angiogene Wachstumsfaktoren enthält, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung.

WO 00/074741 A3

THIS PAGE BLANK (USPTO)